

Année 1963 - n° 16

T H E S E S

présentées

à la Faculté mixte

de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 19 novembre 1963

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

par

Jean Marcel Julien TRONCHET

né le 30 août 1934 à Lyon (Rhône).

- 1) CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION DU
RADICAL LIBRE HYDROXYLE SUR LE D.RIBOSE
- 2) PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Examineurs de thèses

MM. A. CIER

Président

B. DREVON)

L. REVOL)

G. NETIEN)

J.E. COURTOIS)

(Paris)

Assesseurs

Année 1963 - n°

T H E S E S

présentées

à la Faculté mixte

de Médecine et de Pharmacie de LYON

et soutenues publiquement le 19 novembre 1963

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

par

Jean Marcel Julien TRONCHET

né le 30 août 1934 à Lyon (Rhône).

- 1) CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION DU
RADICAL LIBRE HYDROXYLE SUR LE D. RIBOSE
- 2) PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Examineurs de thèses

MM. A. CIER

Président

B. DREVON)

L. REVOL)

G. NETIEN)

J.E. COURTOIS)

(Paris)

Assesseurs



MM. A. CIER

M. BREYER

A. REVOI

A. MEYER

J. E. COOPER

(P. 112)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires

M. J. LEPINE : Membre de l'Institut

M. H. HERMANN : Correspondant
de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : MM. M LEVRAT
L REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURI-
QUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY
DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique.
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique.
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale.
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie.
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B.
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B.
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires.
CROIZAT	Clinique Médicale C.
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A.
REVOL	Pharmacie galénique
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A.
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie

MM. COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligra- phie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-ptisiologie
CREYSEL	Clinique traumatologique des membres,
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respira- toires.
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B.
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation phar- maceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A.
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirur- gie opératoire.
X.....	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge.
X.....	Biologie médicale et pharmacodyna- mie.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-Chirurgie
COLLET	Chimie pharmaceutique
SARROUY	Clinique de pédiatrie

MM. LACROIX	Climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
GARIN	Parasitologie
PINET	Electro-radiologie
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
TOLOT	Médecine du travail
DESPIERRES	Médecine générale
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. DUROUX	Anatomie
BRETTE	Thérapeutique
BOUCHET	Anatomie
FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie
GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
RIFAT	Hygiène
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie

MM. FLANDROIS	Physiologie
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie

AGREGES EN EXERCICE

MM. BURTHIAULT	Obstétrique
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
GIGNOUX	Oto-Rhino-Laryngologie
GUILLEMIN	Chirurgie générale
JAUBERT de BEAUJEU	Chirurgie générale
MARION Pierre	Chirurgie générale
MICHAUD	Chirurgie générale
PLAUCHU	Médecine générale
PONT	Médecine générale
SAUTOT	Chirurgie générale
TRAEGER	Médecine générale
VIGNON	Médecine générale
BONAMOUR	Ophtalmologie
COLIN	Médecine légale
COLOMB	Dermatologie
de MOURGUES G.	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
KALB	Pneumo-phtisiologie
LARBRE	Médecine générale
MARET	Chirurgie générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture
DUMAS	Stomatologie
FRIES	Médecine générale
GARMIER	Obstétrique
LAMBERT	Médecine générale
MICHOULIER	Chirurgie générale
NOEL	Médecine générale
ROBERT	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. A. CIER

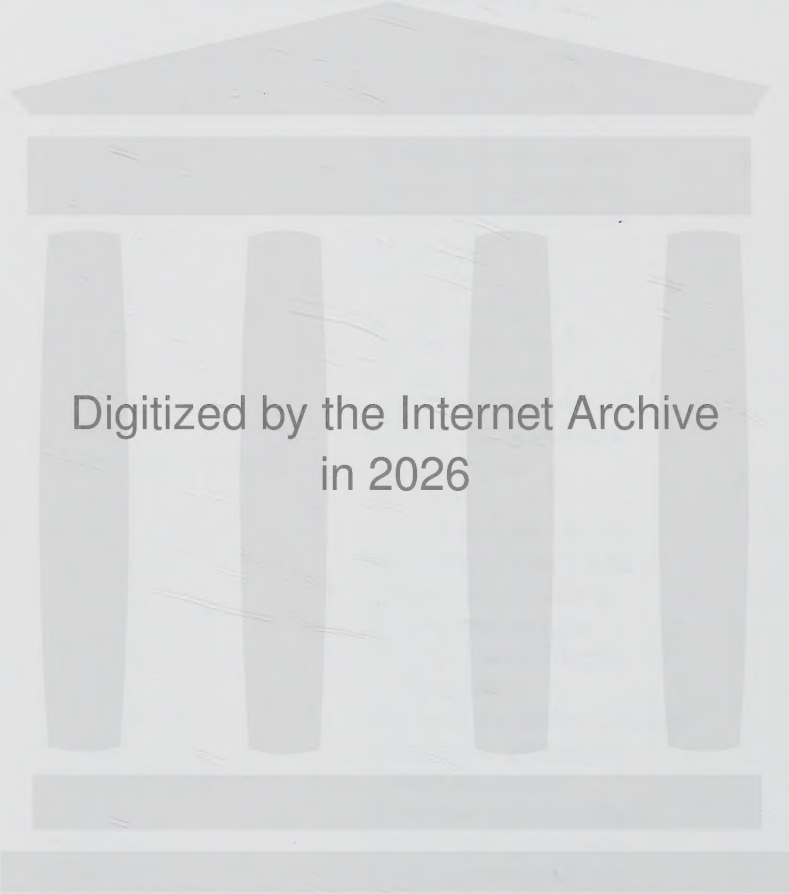
B. DREVON

L. REVOL

G. NETIEN

J.E. COURTOIS (PARIS)

oOo



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553221_0026

A ma Femme,

A mes Parents,

A mes Frères,

A ma Famille,

A mes Amis,

Au Président de notre Jury

Monsieur le Professeur A. CIER

qui nous a donné notre sujet de Thèse
et a bien voulu mettre à notre disposition
les moyens matériels considérables de
son Laboratoire.

Au cours de ce travail, il nous a prodigué
avec sollicitude ses conseils et ses encourage-
ments.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre reconnaissance et de notre res-
pectueux attachement.

Aux membres de notre Jury,

Monsieur le Professeur L. REVOL,
Monsieur le Professeur G. NETIEN,
Monsieur le Professeur B. DREVON,

qui nous ont fait l'honneur et le plaisir
de bien vouloir juger ce travail.

A notre Maître Monsieur le Professeur J. E. COURTOIS

qui en nous faisant l'honneur de bien vouloir faire partie de notre Jury nous a
donné une nouvelle preuve de sa bienveillance à notre égard.

A Monsieur le Pharmacien-Capitaine NOFRE,

qui nous a prodigué ses conseils avisés
et nous a témoigné un intérêt constant
tout au long de ce travail.

En témoignage d'amitié et de reconnaissance.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

A - GENERALITES

I - Le radical libre hydroxyle - Nature
Modes de formation:

I₁ - Le radical libre hydroxyle

I₂ - Formation de radicaux libres hydroxyles
par voie physique.

I₂-1- Formation de radicaux libres hydroxyles
par radiolyse de l'eau au moyen de radia-
tions de grande énergie corpusculaires ou
électromagnétiques.

I₂-2 - Formation de radicaux libres hydroxyles
par des réactions photochimiques provo-
quées par irradiation U. V.

I₃ - Formation de radicaux libres hydroxyles par
voie chimique.

I₃-1- Formation de radicaux libres hydroxyles
par des systèmes redox comportant du
peroxyde d'hydrogène.

I₃-2- Formation de radicaux libres hydroxyles
par des systèmes redox comportant de
l'oxygène moléculaire.

II - Action du radical libre hydroxyle sur les sucres et
les composés apparentés .

B - TRAVAIL PERSONNEL

I- Première partie : Etude qualitative de l'action sur le
D-ribose des radicaux libres hydroxyles engendrés
par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

I₁ - Conditions expérimentales de l'attaque radica-
laire.

I₂ - Analyse chromatographique des produits de
dégradation du D-ribose.

I₂-1 - Techniques chromatographiques utilisées

I₂-2 - Techniques utilisées pour la synthèse de produits nécessaires à l'expérimentation.

I₂-3 - Résultats obtenus.

I₃ - Séparation des produits de dégradation du D-ribose en une fraction "acide" et une fraction "neutre"

I₃-1 - Analyse qualitative de la fraction acide.

I₃-1-1 - Etude par chromatographie sur papier

I₃-1-2 - Etude par chromatographie sur acide silicique.

I₃-1-3 - Recherche des acides oxoaldoniques.

I₃-1-4 - Recherche des acides uroniques.

I₃-2 - Analyse qualitative de la fraction neutre.

I₃-2-1 - Etude par chromatographie sur papier.

I₃-2-2 - Action de la 2-4-dinitrophénylhydrazine.

I₃-2-3 - Action du 1-2-diamino-4-nitrobenzène.

I₃-2-4 - Réduction.

I₃-2-5 - Oxydation.

II - Deuxième partie : Etude du mécanisme de la dégradation du D-ribose sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

II₁ - Dosage volumétrique de l'acidité apparue.

II₂ - Essais à l'aide de molécules marquées.

II₂-1- Appareillage.

II₂-2- Molécules marquées utilisées.

II₂-3- Protocole opératoire.

II₂-4- Précision des mesures

II₂-5- Détermination des niveaux d'attaque.

II₂-6- Détermination des rendements relatifs.
Mécanismes dégradatifs.

II₂-6-1- Formation de dérivés volatils.

II₂-6-2- Variations de l'activité de la fraction "acide".

III

II₂-6-3- Variations de l'activité des produits "neutres".

II₂-6-4- Modalités de formation des différents "acides".

III-Troisième partie : Etude de l'action sur le D-ribose des radicaux libres hydroxyles engendrés par un réactif de Fenton modifié.

III₁ - Protocoles expérimentaux et techniques analytiques.

III₂ - Résultats obtenus.

IV - Quatrième partie : Essai d'interprétation des résultats.

V - CONCLUSIONS GENERALES

oOo

INTRODUCTION

Il est actuellement unanimement admis que les lésions biologiques provoquées par les radiations ionisantes sont dues à l'action de ces radiations sur des "bio-molécules" de la cellule, tout particulièrement sur les acides nucléiques.

Les radiations ionisantes agissent sur les milieux biologiques selon deux mécanismes d'ailleurs contemporains dont l'un, l'attaque directe des molécules organiques, est peu important, et l'autre, l'attaque indirecte, prépondérant. Les agents de cette attaque indirecte sont les produits formés lors de la radiolyse de l'eau, solvant universel de la matière vivante. Cette radiolyse de l'eau - phénomène primaire et phénomène princeps de l'attaque par les radiations - amène l'apparition dans le milieu d'un certain nombre d'entités chimiques (molécules, ions-radicaux et radicaux libres), mais c'est à une seule d'entre elles - le radical libre hydroxyle - que doit être rapportée la plus grande partie des effets de l'irradiation.

L'action des rayonnements de haute énergie sur les acides nucléiques porte surtout sur les bases (80 %), mais également sur les ose associés (20 %). Alors que la dégradation des bases puriques et pyrimidiques a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, celle du ribose et du désoxy-ribose a été beaucoup moins étudiée bien que leur part dans les effets lésionnels globaux puisse être très importante.

Dans le cadre des travaux de la Division de Chimie et de Pharmacologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées sur les effets chimiques et biologiques du radical libre hydroxyle, nous avons été amenés à étudier l'action de ce "réactif" sur un des sucres constitutifs des acides nucléiques, le D - Ribose.

Or, comme nous le verrons dans le chapitre "Généralités" de ce travail, la formation de radicaux libres hydroxyles n'est pas l'apanage de l'action sur l'eau des rayonnements de grande énergie. Aussi, avons nous choisi, pour cette expérimentation, d'autres systèmes producteurs de radicaux libres hydroxyles présentant l'avantage d'exercer une action qui ne peut être due qu'à un

effet indirect : le système peroxyde d'hydrogène-rayons U. V. et le système Fe II-peroxyde d'hydrogène.

L'étude de l'action d'un tel radical libre sur un composé biochimiquement important comme le D - Ribose est également intéressante en ce sens qu'on s'accorde de plus en plus à penser que de nombreuses hydroxylations biochimiques pourraient faire intervenir ce radical (56). C'est le cas, par exemple, de la cyclisation du squalène en lagnostérol (56) et de l'hydroxylation, par l'organisme animal, d'un certain nombre de composés aromatiques (20, 155).

Les schémas réactionnels radicalaires (*) sont d'ailleurs utilisés pour rendre compte d'un nombre toujours plus grand de réactions de la Chimie organique et de la Chimie biologique. On sait que de telles réactions sont caractérisées par le fait qu'elles font intervenir des radicaux libres (c'est-à-dire des entités chimiques possédant un électron célibataire et provenant de la scission homolytique d'une molécule) et qu'elles se ramènent toujours à une série de découplages et d'appariements d'électrons ayant lieu successivement ou simultanément, alors que les réactions ioniques font intervenir des transferts de doublets électroniques (69, 77, 82, 149).

Nous nous proposons d'exposer dans la partie originale de ce travail les résultats que nous avons obtenus en soumettant à l'action du radical libre hydroxyle un constituant des acides nucléiques, le D - Ribose, après avoir rappelé, dans un chapitre groupant les généralités, les divers modes de formation de ce radical libre et les effets déjà décrits de son action sur les oses et les composés apparentés.

oOo

(*) ou radicaliques, ces deux termes étant équivalents.

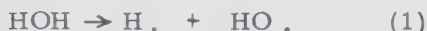
A - GENERALITES

I - LE RADICAL LIBRE HYDROXYLE - NATURE - MODES DE FORMATION.

I₁ - Le radical libre hydroxyle

Le radical hydroxyle provient de la rupture homolytique de molécules possédant un groupement hydroxyle. Les molécules les plus généralement utilisées pour la production de ce radical libre sont l'eau et le peroxyde d'hydrogène.

Dans le cas de l'eau, la rupture homolytique s'écrit :



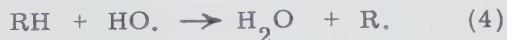
Le radical libre hydroxyle $\text{<O}^\cdot : \text{H}$ est neutre et paramagnétique (il possède en effet un électron célibataire). Son existence a été prouvée par spectroscopie (doublets dans les spectres vers 3064 Å) (19). Son intérêt provient de sa grande réactivité chimique. C'est en particulier l'un des plus énergiques parmi les oxydants connus.



Sa réactivité conditionne la rapidité avec laquelle il disparaît des milieux où il est engendré soit par attaque d'un substrat, soit par combinaison avec lui-même selon :



Les composés organiques soumis à son action sont très généralement attaqués selon le schéma suivant :



Le radical libre organique formé réagit lui-même à son tour suivant différentes modalités, caractéristiques de sa nature radicalaire :



ou avec un autre radical libre organique :



- fixation d'oxygène moléculaire :



- combinaison avec un radical libre hydroxyle :



Des radicaux libres hydroxyles peuvent être engendrés soit par voie physique, soit par voie chimique.

Quelle que soit l'origine de l'entité oxydante formée, sa nature radicalaire a pu être mise en évidence par :

- la formation de radicaux libres organiques susceptibles de se dimériser ou de se polymériser (11 -16, 38, 50, 51, 96), c'est ainsi que des systèmes chimiques générateurs de radicaux libres HO. sont utilisés industriellement comme initiateurs de polymérisation (155).

- l'hydroxylation de composés aromatiques mono ou disubstitués et l'étude quantitative des différents isomères de position formés (2, 10, 52, 80, 93, 146 -148).

1₂ - Formation de radicaux libres hydroxyles par voie physique

Nous citerons pour mémoire la dissociation thermique de l'eau au cours de laquelle des radicaux libres hydroxyles ont été mis en évidence par spectroscopie (19).

Les techniques de production de radicaux libres hydroxyles les plus utilisées font appel soit aux radiations électromagnétiques ou corpusculaires de grande énergie, soit à des réactions photochimiques mettant en jeu des radiations électromagnétiques de plus faible énergie (U.V.)

1₂-1 - Formation de radicaux libres hydroxyles par radiolyse de l'eau au moyen de radiations de grande énergie, corpusculaires (rayons α , β , neutrons) ou électromagnétiques (rayons X, γ)

L'action des rayons α sur l'eau a été étudiée dès le début du siècle, en particulier par RAMSAY et SODDY (134) et par DEBIERNE (43, 44). Dès 1914, DEBIERNE a proposé d'expliquer la "radiolyse" par la formation de radicaux libres hydroxyles et d'atomes d'hydrogène.

Le problème de la radiolyse de l'eau a été entre les deux guerres l'objet d'un certain nombre de travaux dus surtout à FRIC-

KE et coll. (58 - 60) qui ont établi solidement les premières bases de la chimie des radiations. L'intérêt porté pendant la dernière guerre à la chimie nucléaire a suscité de nombreuses recherches radiochimiques, et en 1944 WEISS (157) en Angleterre, a proposé une théorie radicalaire de la radiolyse de l'eau rendant compte de tous les faits alors connus. Le schéma de WEISS a été dans ses grandes lignes confirmé par les très nombreux travaux consacrés depuis à ce sujet et rappelés dans quelques revues récentes (3, 34, 66, 91, 116).

D'après les conceptions actuelles, les modifications chimiques affectant les corps soumis en solution aqueuse diluée à une irradiation de haute énergie, corpusculaire ou électromagnétique sont dues à un effet indirect. Lorsque l'ensemble soluté-solvant est soumis à l'irradiation c'est le composé dont la concentration est la plus élevée (en l'espèce le solvant) qui est transformé. Les nouvelles espèces chimiques formées depuis le solvant (l'eau est le seul solvant que nous considérerons ici) réagissent alors sur les molécules de soluté.

Quelle que soit la nature de la radiation incidente, électromagnétique ou corpusculaire, les entités chimiques qui se forment dans l'eau irradiée sont les mêmes. En effet, le transfert final d'énergie a toujours lieu par l'intermédiaire de particules chargées. Dans le cas des radiations électromagnétiques les photons très riches en énergie, arrachent des électrons au nuage électronique des molécules de solvant; ces électrons dits secondaires possèdent en général suffisamment d'énergie pour ioniser à leur tour de nouvelles molécules d'eau et la part prise dans le phénomène par la première molécule atteinte est généralement négligeable. Dans le cas d'irradiation par des particules chargées, celles-ci conduisent à des effets similaires à ceux des électrons secondaires.

Lorsque l'irradiation est de nature électromagnétique, le mécanisme actuellement admis est le suivant :

Les radiations électromagnétiques de faible énergie arrachent un électron à une molécule de solvant, cet électron arraché dit photoélectron possède une énergie bien déterminée égale à la différence entre l'énergie du photon et l'énergie d'ionisation nécessaire à l'arrachement de l'électron. Dans la molécule de solvant ainsi ionisée peuvent se produire une ou plusieurs transitions AUGER (l'effet AUGER consiste dans la chute d'un électron plus extérieur dans l'orbitale libérée par le départ du photoélectron avec émission non d'un photon X mais d'un autre électron périphérique).

Pour les radiations électromagnétiques plus énergétiques (γ , rayons X durs) l'effet photoélectrique est négligeable; les ionisations ont lieu par effet COMPTON. Le photon perd son énergie par diffusion inélastique en un nombre fini très généralement élevé de transferts d'énergie corrélatifs d'une augmentation progressive de sa longueur d'onde. Les molécules sont ionisées avec émission d'électrons dits de recul, dont l'énergie est quelque, évidemment comprise néanmoins entre 0 et l'énergie du photon incident; Ces électrons de recul vont à leur tour ioniser et exciter les molécules du solvant.

Les électrons d'énergie insuffisante pour exciter les molécules de solvant sont appelés électrons de sous-excitation; ils ont une vie très longue et sont d'après PLATZMANN (133) susceptibles d'exciter les molécules de soluté ayant des niveaux d'excitation plus bas que ceux du solvant.

Les molécules d'eau sous l'effet du photon ou d'un électron de recul vont s'ioniser. Dans le cas de l'ionisation par un électron de recul primaire e_1 , on peut écrire;



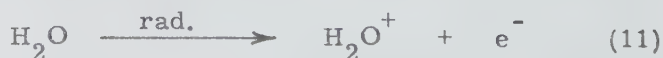
où e_2 est l'électron de recul secondaire et e_s l'électron secondaire.

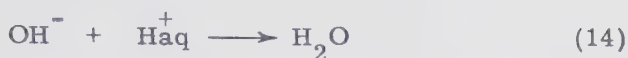
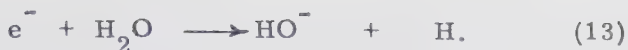
Cette réaction a lieu 10^{-16} à 10^{-18} seconde après le passage de la particule chargée. H_2O^+ est ensuite converti en un radical HO. en 10^{-12} seconde :



La radiolyse de l'eau amène également la formation d'atomes d'hydrogène. Le mécanisme le plus universellement admis est le suivant : capture, par les molécules d'eau, d'électrons, électrons de recul secondaire (65, 89) ou électrons de sous excitation captés loin de l'ion parent (17, 133).

On admet que les mécanismes primaires de la radiolyse amènent la formation de radicaux libres OH et d'atomes d'hydrogène selon les réactions suivantes :





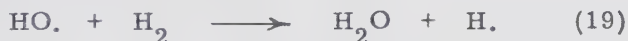
Le résultat global des phénomènes primaires de la radiolyse de l'eau peut donc être représenté par :



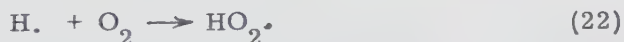
Outre la formation d'atomes libres d'hydrogène et de radicaux libres hydroxyles, la radiolyse de l'eau engendre, par des mécanismes secondaires, des molécules et de nouveaux radicaux. Les radicaux libres primaires vont en effet, soit réagir sur le soluté, soit se recombinaison selon les réactions :



Il vont également réagir sur les produits moléculaires ainsi formés selon



La réaction (21) met en évidence la formation d'un radical libre perhydroxyle $\text{HO}_2\cdot$ qui peut également provenir de la réaction :



Ce radical libre est un acide assez fort ($\text{pK} = 2$) qui se dissocie selon :



L'existence dans l'eau irradiée de l'ion hydrogène moléculaire H_2^+ est plus controversée.

On voit donc que la radiolyse de l'eau engendre un assez grand nombre d'entités chimiques. Les rendements relatifs en $\text{H}.$, $\text{OH}.$, H_2 et H_2O_2 dépendent des distances séparant les lieux de

formation des différents radicaux, ces caractéristiques géométriques conditionnant les recombinaisons. Ces rendements relatifs sont en particulier très différents dans le cas d'irradiation α où la densité d'ionisation le long du trajet de la particule est très grande et dans le cas d'irradiation γ où les ionisations sont plus clairsemées.

Il n'en reste pas moins que dans tous les cas, les effets des radiations ionisantes sur des solutions aqueuses doivent être rapportées essentiellement à la formation du radical libre OH.

I₂⁻² - Formation de radicaux libres hydroxyles par des réactions photochimiques provoquées par irradiation U. V.

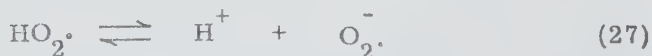
Sous l'effet des rayons U. V. un transfert électronique générateur de radicaux libres hydroxyles peut avoir lieu dans des complexes du type $\text{Fe}^{3+} \text{OH}^-$ (10, 51)



Les mêmes radicaux libres sont également produits par photolyse de l'acide nitrique (18) mais la technique de choix pour la production de ces radicaux est la photolyse du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet des rayons U. V. de longueur d'onde inférieure à 3700 Å la molécule de peroxyde d'hydrogène subit une scission homolytique selon :



les radicaux libres hydroxyles formés servent d'initiateurs à une réaction en chaîne (83) qui se propage selon :



La chaîne peut se rompre selon :



ou d'après LEA (88) selon :



Il semble que des atomes libres d'oxygène puissent intervenir également (48, 76), néanmoins la photolyse du peroxyde d'hydrogène

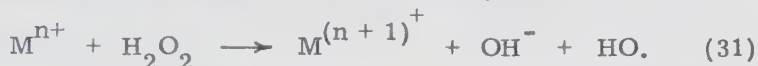
fournit des entités chimiques moins nombreuses et plus sûrement identifiées que la radiolyse de l'eau (70). L'action sur un substrat du système peroxyde d'hydrogène-U. V. peut être rapportée pour sa quasi-totalité à celle des radicaux libres hydroxyles formés.

I₃ - Formation de radicaux libres hydroxyles par voie chimique.

I₃-1 - Formation de radicaux libres hydroxyles par des systèmes redox comportant du peroxyde d'hydrogène.

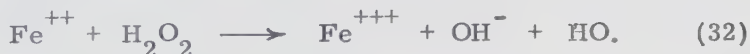
Les radicaux libres hydroxyles peuvent être engendrés dans un système comportant du peroxyde d'hydrogène et un cation minéral oxydable, par une réaction d'oxydo-réduction mettant en jeu un seul électron.

La réaction s'écrit sous la forme générale :



Encore que la plupart des éléments de transition permettent la réaction (32, 152) le système redox le plus usité et le plus actif est le système $Fe^{II} - H_2O_2$ utilisé dès 1894 par FENTON (53, 54) et connu depuis sous le nom de réactif de FENTON.

En 1934, HABER et WEISS (68) proposent de ramener son action à celle de radicaux libres hydroxyles, formés selon le mécanisme suivant



Ce mécanisme est encore reconnu comme le plus satisfaisant (*) à quelques détails près : On a proposé notamment de remplacer la réaction (35) par :



(*) bien que d'autres explications aient été avancées, en particulier l'une faisant intervenir la formation de fer tétravalent (23, 27)

Le réactif $\text{Fe}^{\text{II}} - \text{H}_2\text{O}_2$ a été l'objet de nombreuses améliorations : addition d'agents complexants le Fe^{III} (pyrophosphate de sodium (106) EDTA(*), addition d'EDTA et d'acide ascorbique (151). D'autres systèmes argent I - persulfate de sodium, cuivre - persulfate de sodium sont passés en revue par WALLING (156).

1₃-2 - Formation de radicaux libres hydroxyles par des systèmes redox comportant de l'oxygène.

L'oxygène moléculaire en présence de solutions aqueuses de sels d'éléments de transition à leur degré d'oxydation inférieur est capable d'hydroxyler des substrats organiques. Ces hydroxylation présentent tous les caractères de réactions radicalaires et sont dues à la formation dans ces conditions de radicaux libres hydroxyles. L'édétate ferreux en solution aqueuse aérée, constitue un réactif de ce type. Le réactif d'UDENFRIEND et coll. (25, 151) associant à l'édétate ferreux, l'acide ascorbique qui réduit le fer ferrique formé, encore plus actif, est le plus utilisé de ces systèmes (2, 24, 32, 105).

On pense actuellement avec WEISS (159) que les radicaux libres hydroxyles sont engendrés selon le schéma d'HABER et WEISS (68) à partir du peroxyde d'hydrogène qui se forme par action de Fe^{++} sur l'oxygène selon le schéma :



(*) EDTA = Acide éthylène diamine tétracétique dont nous appellerons les sels "édétates".

II - ACTION DES RADICAUX LIBRES HYDROXYLES SUR LES SUCRES.

Dès la fin du siècle dernier, l'action sur les sucres d'un système producteur de radicaux libres hydroxyles, le réactif de FENTON a été étudiée par CROSS et coll. (37) et par MORREL et CROFTS (98-101). Ces derniers auteurs ont démontré la formation des osones correspondantes, la glucosone à partir du glucose et du fructose, et d'un certain nombre d'acides : acides glycolique, trihydroxybutyrique, glyoxylique, et oxalique.

KUCHLIN (84-85) a mis en évidence la formation à basse température, depuis le glucose, de glucosone, d'acide 2 - céto - gluconique, d'acide dicéto-2-3-gluconique et d'aldéhyde formique. Il a obtenu à plus haute température, les composés suivants : anhydride carbonique, acides formique, oxalique, glycolique, tartronique, glycérique, et trihydroxyglutarique.

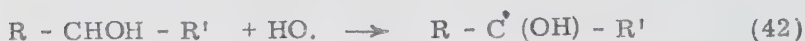
BOURNE et coll. (21) étudiant à nouveau l'action du réactif de FENTON sur le glucose ont mis en évidence les produits suivants, par ordre décroissant d'importance : glucosone, acide gluconique, acide céto-2-gluconique, acide arabonique, acide oxalique, arabinose et anhydride carbonique. A l'heure actuelle, l'étude de l'effet des radiations sur les sucres se développe avec l'utilisation de techniques plus fines faisant intervenir des traceurs radioactifs. PHILLIPS et coll. viennent de consacrer toute une série de travaux à l'étude de la dégradation des sucres sous l'effet des rayons γ (115-123-125-132).

L'étude de la décomposition de sucres marqués au ^{14}C sous l'influence de leur propre émission de radiations a été effectuée par PHILLIPS et coll. (124) et par BOURNE et coll. (21).

Cependant le mécanisme de l'action du radical libre hydroxyle sur les sucres est très mal connu. Le premier temps semble bien être la formation d'un radical libre organique sous l'action d'un radical libre hydroxyle par arrachement à la molécule de sucre d'un atome d'hydrogène.



Ce mécanisme a été bien établi dans le cas d'autres composés hydroxylés qui, par attaque radicalaire, conduisent à des dérivés dont l'apparition ne peut s'expliquer que par la formation d'un radical libre organique engendré selon la réaction :



L'éthanol conduit ainsi au butanediol 2 - 3 (79) ; l'acide glycolique à l'acide tartrique (64). Ce mécanisme est également prouvé dans le cas des glycols (8, 140) et des α - hydroxyacides (81).

Cette réaction est essentiellement provoquée par des radicaux libres hydroxyles. Néanmoins, des considérations de rendement indiquent que dans le cas des irradiations γ ils ne constituent pas la seule espèce chimique provoquant la réaction; On doit donc faire intervenir outre les radicaux libres hydroxyles, soit les atomes d'hydrogène, soit les radicaux $\text{HO}_2\cdot$, soit, ce qui semble plus probable à PHILLIPS et coll. (122) des électrons de sous-excitation. Les radicaux libres organiques formés peuvent soit se polymériser (5, 6, 9, 121, 122) ce qui se produit surtout lors de l'irradiation effectuée en l'absence d'oxygène, soit se scinder en plusieurs fragments oxydés, soit également s'oxyder sans rupture de la chaîne carbonée.

Les cinétiques des réactions permettent de distinguer des processus de dégradation primaires et secondaires.

L'attaque radicalaire primaire se produit en plusieurs points de la molécule du sucre, elle conduit généralement aux acides aldoniques et uroniques correspondants et à des composés à plus faible nombre de carbone, l'attaque portant dans les deux premiers cas, sur les carbones extrêmes, et dans les autres, sur les carbones intermédiaires. Les différents dérivés de dégradation primaire sont alors à leur tour attaqués par les mécanismes dits secondaires.

A l'époque où nous commençons ce travail, la dégradation du D - Ribose sous l'effet des radicaux libres hydroxyles n'avait été étudiée qu'incidemment par WEISS ET coll. à l'occasion de leurs importants travaux sur l'irradiation aux rayons X des acides nucléiques (39, 40, 41, 141, 142, 143, 144). Ces auteurs ont montré que sous l'action des rayons X ou du réactif de FENTON, le D - ribose est dégradé en anhydride carbonique, petites quantités d'acide oxalique, hydroxyacides non déterminés et aldéhydes de faible masse moléculaire non déterminés. Tout dernièrement, ce travail étant déjà en cours, nous avons eu connais-

sance de trois publications intéressant cette question. VAISEY et THATCHER (153) ont signalé qu'il se formait dans les solutions aqueuses de D - ribose soumises à un rayonnement γ des acides et des lactones non déterminées possédant des groupements réducteurs. PHILLIPS et CRIDDLE (123) par l'utilisation de techniques de dilution isotopique ont montré que l'irradiation γ du D - ribose en solution aqueuse oxygénée le dégrade en acide ribonique, D - érythrose, fragments aldéhydiques ou cétoniques à 2 ou 3 carbones, acide oxalique et traces d'acides érythronique et glycolique. PHILLIPS et coll. (124) ont mis en évidence la formation par autodégradation du ribose ^{14}C d'acide ribonique, d'érythrose, d'acide érythronique, d'acide glycolique, d'acide oxalique et de fragments aldéhydiques ou cétoniques à deux et à trois carbones.

Le but qui nous était proposé, était d'étudier la dégradation du D - ribose en solution aqueuse sous l'effet de radicaux libres hydroxyles produits d'une part, par photolyse du peroxyde d'hydrogène, procédé particulièrement sûr et sélectif de production de radicaux libres hydroxyles (70) d'autre part à l'aide d'un réactif de FENTON modifié par chélation du fer. Les travaux que nous venons de citer nous ont permis ainsi de comparer les effets sur le D - ribose des irradiations β ou γ dont nous avons vu qu'ils ne peuvent être totalement rapportés à l'action des radicaux libres hydroxyles et nos propres résultats obtenus en utilisant des systèmes producteurs de radicaux libres hydroxyles plus spécifiques. On peut ainsi espérer distinguer, dans ces conditions, la part qui, dans l'attaque par les radiations ionisantes, revient à des effets directs et à l'action d'entités chimiques autres que le radical hydroxyle.

B - TRAVAIL PERSONNEL

PREMIERE PARTIE

ETUDE QUALITATIVE DE L'ACTION SUR LE
D-RIBOSE DES RADICAUX LIBRES HYDROXYLES
ENGENDRES PAR PHOTOLYSE DU PEROXYDE
D'HYDROGENE

I₁ - CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ATTAQUE RADICALE.

Les radicaux libres hydroxyles sont engendrés dans les solutions de D - ribose en soumettant à l'action de rayons ultra-violetes des solutions aqueuses de ce sucre comportant également du peroxyde d'hydrogène.

La source de rayons ultra-violetes est une lampe à vapeur de mercure (Quartz-Lampen Gesellschaft M. B. H. Hanau) à émission centrée sur 2.537 Å.

La solution soumise à l'irradiation est le plus généralement ainsi constituée :

- D - Ribose	1 mM
- Peroxyde d'hydrogène	2 mM
- Eau distillée q. s. p.	30 ml

Cette solution contenue dans une cuvette en pyrex (surface de base 90 x 140 mm) est placée sur une table oscillante de DALE (*) sous la lampe à vapeur de mercure et à une distance invariable de celle-ci.

Les solutions sont soumises à des irradiations d'une durée variant d'une heure à douze heures.

L'intensité lumineuse reçue par la solution est mesurée en irradiant dans les conditions précisées ci-dessus une solution d'oxalate d'uranyle selon la technique préconisée par BOWEN (22) Cette énergie est de $1,43 \cdot 10^{-4}$ einstein/heure.

Dans ces conditions opératoires, il existe toujours, quelle que soit la durée de l'irradiation, un excès de peroxyde d'hydrogène.

(*) Cette table oscillante fait partie de l'appareillage de microdiffusion de CONWAY.

I₂ - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS DE DEGRADATION DU D-RIBOSE

Après irradiation, le mélange réactionnel est concentré en vue des opérations ultérieures. Pour ce faire, nous avons d'abord utilisé concurremment la lyophilisation et la concentration sous pression réduite au bain-marie à 30-40°. Ces deux techniques donnant les mêmes résultats, nous n'avons utilisé par la suite que la seconde d'entre elles, de mise en oeuvre plus aisée. Le mélange, après concentration jusqu'à consistance de sirop épais, est repris par environ 1 ml d'eau et soumis à l'analyse chromatographique.

I₂-1 - Techniques chromatographiques utilisées

Nous employons surtout la chromatographie descendante réalisée soit dans des cuves parallélipédiques permettant la chromatographie bidimensionnelle, soit dans des cuves cylindriques plus hautes permettant des migrations de près de 50 cm. Sauf indication contraire, le papier utilisé est du papier WHATMAN n°1.

Les systèmes solvants auxquels nous avons le plus habituellement recours sont les suivants :

Système I : - n-butanol/ acide formique/ H₂O 7 : 3 : QS pour saturation (nButOH/AF/H₂O) (109) phase supérieure.

Système II : Acétate d'éthyle/ acide acétique/ eau 3 : 1 : 3 (ACOEt/Ac OH/H₂O) (78) phase supérieure

Système III - n-butanol/acide acétique / eau 4 : 1 : 5 (n ButOH/ AcOH/H₂O) (112) phase supérieure.

Système IV - ether éthylique/ acide acétique/ eau 13 : 3 : 1 (EtOEt/AcOH/H₂O) (47) phase supérieure

Système V - ethanol/ ammoniaque d = 0, 92/ eau 80:5:15 (30) (EtOH/NH₄OH/H₂O)

Système VI - n-butanol/ethanol/ eau 4 : 1 : 5 (74) (nButOH/EtOH/H₂O) phase supérieure.

Système VII - n-butanol/pyridine/eau 6:4:3 (42) (n ButOH/
Pyridine/H₂O)

Les quatre premiers solvants donnent de bonne séparations des acides que nous avons rencontrés. Le solvant V est également intéressant pour la séparation des acides mais présente l'inconvénient d'hydrolyser partiellement pendant la migration les olides d'acides aldoniques et d'amener ainsi la formation pour chacun de ces corps de deux taches reliées par une trainée. Les deux derniers solvants ont été surtout utilisés pour la séparation des produits neutres. Nous effectuons le plus généralement des chromatographies à écoulement continu et déterminons les R_T (*) des différents composés par rapport à l'acide glycolique R_{Gl} ou au ribose R_R .

Après développement les chromatogrammes sont séchés sous une hotte ventilée et les produits révélés à l'aide des techniques ci-dessous:

- Révélation ferrocyanure-alun de fer selon (28). Cette technique déjà utilisée au Laboratoire par GONDOT (63) pour la révélation d'acides organiques, présente l'avantage d'être très polyvalente et de donner des colorations assez variées (cf. tableau II).

Une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10 % est pulvérisée sur la feuille parfaitement séchée. Après séchage d'une heure à l'air libre, pulvériser une solution fraîchement préparée d'alun de fer à 0,5 % dans de l'éthanol à 70°. Certaines taches apparaissent dont on note les positions et les couleurs. Sécher 5 minutes à l'étuve à 100° et pulvériser une solution environ normale d'hydroxyde d'ammonium qui décolore le fond du papier. Noter l'apparition éventuelle de nouvelles taches et la couleur des taches après séchage lorsque le fond du papier s'est recoloré en vert clair. Les acides carboxyliques donnent des taches colorées dès la pulvérisation de l'alun de fer alors que les olides d'acides aldoniques et les oses n'apparaissent qu'après pulvérisation de l'hydroxyde d'ammonium. Le tableau (II) indique les différentes colorations obtenues après pulvérisation de l'alun de fer (colonne 5) et après pulvérisation de l'hydroxyde d'ammonium (colonne 6).

(*) Vitesse de migration relative, déterminée par rapport à un témoin :

$$R_T = \frac{\text{déplacement d'un composé}}{\text{déplacement d'un témoin.}}$$

- Révélation au réactif de NORDMANN (108)

Ce réactif est un indicateur de pH obtenu par dissolution dans 500 ml d'éthanol absolu de :

- . 0,1 g de Phénolphtaléine
- . 0,2 g. de rouge de méthyle
- . 0,3 g de diméthylaminoazobenzène
- . 0,4 g de bleu de bromothymol
- . 0,5 g de bleu de thymol.

Les acides donnent des taches rouges ou orangées, les olides des taches jaune-orangé, le fond du papier est jaune.

- Révélation au réactif d'ABDEL AKHER ET SMITH (1)

Pulvériser d'abord une solution obtenue par mélange de volumes égaux d'une solution méthanolique normale de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'une solution 1,1 N de soude dans le méthanol.

Après séchage à l'air libre, pulvériser une solution de perchlorure de fer à 1 ou 2 % dans de l'acide chlorhydrique à 1 %.

Cette technique de révélation est très spécifique des olides qui apparaissent en rouge, dès pulvérisation du perchlorure de fer pour disparaître assez vite ensuite. Les acides aldoniques donnent de très faibles colorations orangé-bistre, d'apparition beaucoup plus tardive.

- Révélation par la technique au periodate-benzidine de CIFONELLI et SMITH (33)

Pulvériser légèrement sur le papier une solution aqueuse saturée de paraperiodate de sodium (CIFONELLI et SMITH utilisent le métaperiodate). Après 6 à 10 minutes d'attente, pulvériser le réactif à la benzidine :

- . 10 volumes de solution 0,1 M de benzidine dans l'éthanol à 50 %
- . 2 volumes d'acétone
- . 1 volume d'acide chlorhydrique 0,2 N.

Les composés à groupement α -glycol apparaissent comme des taches blanches à jaune pâle sur fond bleu (passant au brun assez rapidement).

- Révélation par le réactif au naphtorésorcinol de DEDONDER (46)

Après pulvérisation du réactif : naphtorésorcinol : 100 mg

HCl 2 N 20 ml

n-propanol q.s.p. 100 ml

seuls les acides uroniques développent à froid une coloration bleue sur fond rose pâle (46).

- Révélation par le réactif de LANNING et COHEN (86) à l'o-phénylènediamine.

Le réactif consiste en une solution à 2 % du dichlorure de la diamine dans l'éthanol à 80°. Il donne avec les acides oxo-2-aloniques, après chauffage de quelques minutes à 100° des taches gris-vert ou fluorescent en gris vert. Nous avons remarqué qu'il était également très intéressant pour révéler la ribosone qu'il colore en bleu à froid.

- Révélation au 1-2-diamino-4-nitrobenzène (DANB)

Nous utilisons un mélange constitué d'une solution de 190 mg de DANB dans 10 ml d'acide chlorhydrique 2N et de 10 ml d'alcool absolu. Nous obtenons avec ce réactif les résultats suivants : à froid, la ribosone se colore en orangé et présente une fluorescence violette, le ribose prend une faible coloration rosâtre. Les acides α -cétoniques tels que l'acide α -cétoglutarique donnent des taches jaune-grisâtres, fluorescent en mauve sous les U.V.

- Révélation au 2-6-dichlorophénol-indophénol (31)

Avec une solution aqueuse de 2-6 dichlorophénol indo-phénol à 0,08 %, les composés à groupement énediol apparaissent comme des taches blanches sur fond bleu.

- Révélation au réactif de GODIN (62) à la vanilline

Préparé par mélange de volumes égaux d'une solution éthanolique à 1 % de vanilline et d'une solution aqueuse à 3 % d'acide perchlorique, ce réactif révèle les polyols qui prennent des colorations allant du rose au mauve-violacé.

- Révélation au réactif de PARTRIDGE au phtalate d'aniline (113).

Ce réactif préparé par dissolution d'aniline (0,93 g) et

d'acide phtalique (1,66 g) dans 100 ml de n-butanol saturé d'eau, colore après chauffage de quelques minutes à 100°, les aldopentoses en brun-rose et les aldotétraoses en jaune brun.

- Révélation par un réactif à la β -naphtylamine et au thymol (36).

Ce réactif dont la composition est la suivante :

. thymol	1 g
. β - naphtylamine	0,10 g
. acide orthophosphorique	2 ml
. éthanol à 80° qsp	150 ml

donne des colorations variées avec les différentes classes de sucres.

- Révélation à la 2-4-dinitrophénylhydrazine :

Pulvériser une solution saturée de 2-4-dinitrophénylhydrazine dans de l'acide chlorhydrique N. Après séchage, noter la position et la coloration des taches puis pulvériser une solution N d'hydroxyde de sodium. Le réactif révèle les osones, les aldéhydes et les cétones.

- Révélation spécifique de l'acide glyoxylique : Réactif de FOSSE et coll. (57) ; adapté à la chromatographie sur papier par GONDOT (63) :

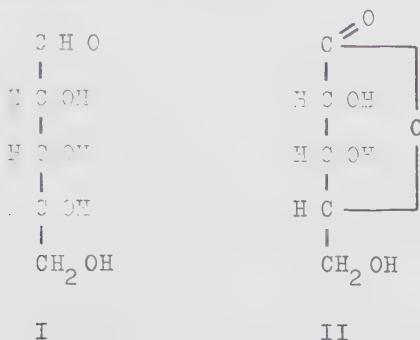
Le réactif utilisé est une solution aqueuse fraîchement préparée de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 %. Après un chauffage de 3 minutes à l'étuve à 80°, pulvériser de l'acide chlorhydrique pur (d = 1,19) puis une solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 5 %. L'acide glyoxylique se révèle en violet rouge. L'acide glycolique donne une coloration rose extrêmement faible.

1-2 - Techniques utilisées pour la synthèse de produits nécessaires à l'expérimentation.

Un certain nombre de composés qui nous étaient indispensables pour ce travail comme substances "témoins" n'étant pas disponibles commercialement, nous avons dû les préparer par synthèse au Laboratoire.

I₂-2-1 - Préparation de l'acide D-ribotrihydroxyglutarique

Ce produit peut être obtenu par oxydation nitrique soit du D-ribose (I) (92) soit de la γ -D-ribonolactone (II) (55). C'est cette dernière technique, conduisant à de meilleurs rendements que nous avons utilisées :



a) Préparation du ribotrihydroxyglutarate de Ca

Chauffer doucement au bec Bunsen, dans une capsule de platine 3,7 g de γ -D-ribonolactone avec 9,25 g d'acide nitrique de densité 1,2. Une vive réaction se produit ; maintenir le chauffage une vingtaine de minutes jusqu'à évaporation de la presque totalité de l'acide.

Le sirop est repris par 60 ml d'eau et bouilli une heure avec un excès de CaCO_3 dont l'addition amène le pH à 6,4 - 6,5.

Le mélange est ensuite additionné d'un peu de charbon actif et filtré à chaud. Après une nuit en glacière nous obtenons 0,87 g de ribotrihydroxyglutarate de Ca sous forme de poudre fine cristalline. 0,48 g du même produit sont obtenus par précipitation fractionnée des eaux-mères par addition d'alcool selon (92).

b) Préparation de l'acide ribotrihydroxyglutarique

800 mg de ribotrihydroxyglutarate de Calcium sont digérés à l'ébullition avec la quantité calculée d'acide oxalique en solution aqueuse; le mélange est filtré sur charbon et la solution cristallise en masse par évaporation sous vide à 60°.

Le produit obtenu est recristallisé deux fois dans l'acétate d'éthyle, puis séché à 105°. Il pèse environ 100 mg et se présente sous forme de petites aiguilles. C'est la monolactone de l'acide ribotrihydroxyglutarique (III) :



(*) Les spectres I. R. ont été réalisés et interprétés par le Médecin Commandant FONTANGES, Chef du Laboratoire de Biochimie Moléculaire, Section de Bactériologie du CRSSA, que nous remercions très vivement.

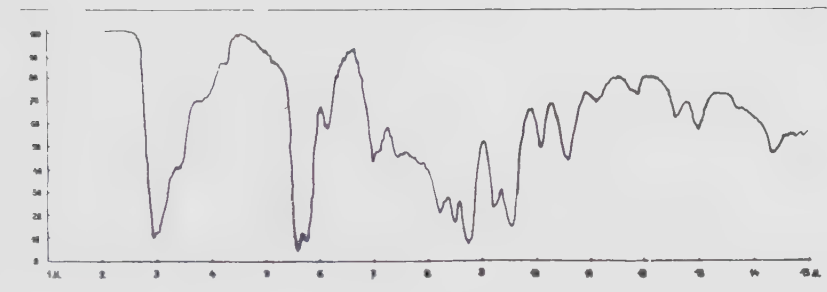


Figure 1 - Spectre infra-rouge de l'acide ribotrihydroxyglutarique.

Méthode KBr. 2 mg de produit par g de KBr ; enregistrement : 1 minute/
Amplification : 6,0. Amortissement : 7,4. Prisme NaCl. Spectrographe I.R.
Leitz Wetzlar n° 150.

au bain marie bouillant et chauffée pendant 40 minutes avec un excès de brucine. Après refroidissement, l'excès de brucine est éliminé par extraction au chloroforme. La solution de sel de brucine est évaporée jusqu'à consistance de sirop épais. Ce sirop est repris par 25 ml d'éthanol absolu bouillant et filtré à 60°. Après une nuit de glacière, il précipite environ 0,6 g d'érythronate de brucine sous forme d'une poudre brun clair.

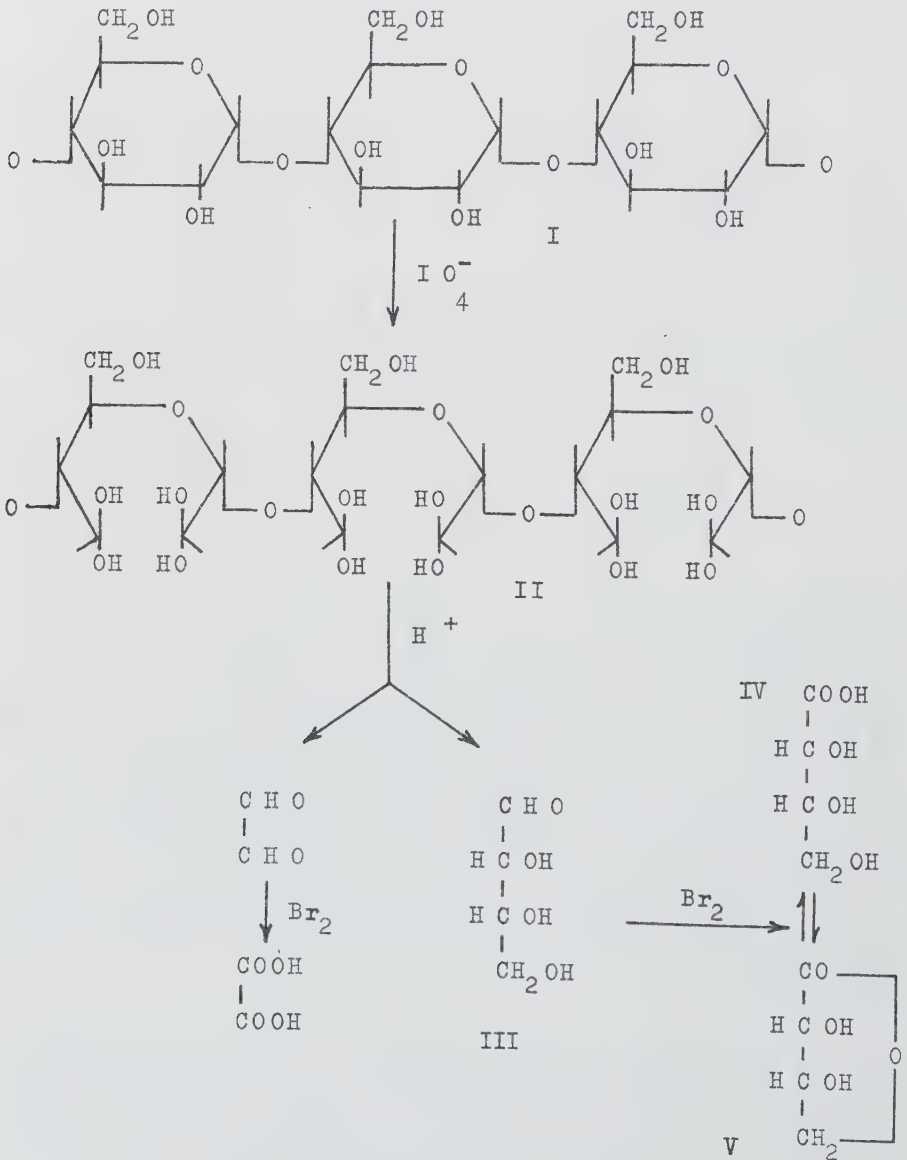
Nous obtenons l'acide érythronique en détruisant le sel de brucine par de la baryte, en éliminant la brucine libérée, par extraction chloroformique et les cations Baryum par passage sur résine Dowex 50 en cycle H^+ . La solution ainsi purifiée est évaporée à sec à 50° sous vide; elle se présente comme une gomme. Cette gomme est reprise par de l'éthanol absolu et évaporée à sec sous vide plusieurs fois, puis reprise par de l'acétate d'éthyle bouillant (NEF 102) qui en dissout la plus grande partie. A la glacière, l'acétate d'éthyle laisse cristalliser la D-érythronolactone sous forme d'aiguilles blanches bien formées. $F = 102^\circ$ (102 ou 103° dans la littérature).

b) - Préparation de la D-érythronolactone depuis l'amidon.

Nous préparons également la D-érythronolactone par la technique d'OVEREND et coll.(110) faisant intervenir l'oxydation périodique de l'amidon. Une suspension d'amidon (3,6 g) dans une solution d'acide métaperiodique (5 g.) dans l'eau (78 ml) est maintenue une semaine à 20-25° sous agitation continuelle. Après ce temps le dialdéhyde polymérisé obtenu (II) est séparé par filtration et lavé à l'eau glacée. Il réduit immédiatement à froid la liqueur de Fehling. Le dialdéhyde est chauffé 3 heures à 100° dans 100 ml d'eau, la solution obtenue est filtrée, additionnée de 25 ml d'HCL N, amenée à 250 ml, maintenue 16 heures au bain-marie bouillant en ampoule scellée, puis après cette hydrolyse, elle est décolorée par un peu de charbon et filtrée. Elle contient de l'érythrose, et du glyoxal qui précipite à froid avec la phénylhydrazine.

Nous lui ajoutons 5 ml de brome et la maintenons 4 jours à l'obscurité. Après ce temps, la solution est débarrassée de l'excès de brome par un courant d'azote, de l'acide oxalique par de la baryte, des halogènes par de l'oxyde d'argent; elle est ensuite soumise à l'action d'un courant d'acide sulfhydrique, filtrée, chauffée pour éliminer l'excès d'hydrogène sulfuré et enfin, après refroidissement, passée sur colonne de Dowex 50 en cycle H^+ . La solution ainsi débarrassée des ions gênants, est,

après concentration, traitée par la brucine comme dans la technique précédente, et l'érythronate de brucine obtenu conduit de la même façon à la D-érythronolactone cristallisée. Le schéma suivant rappelle les différentes étapes de cette synthèse.



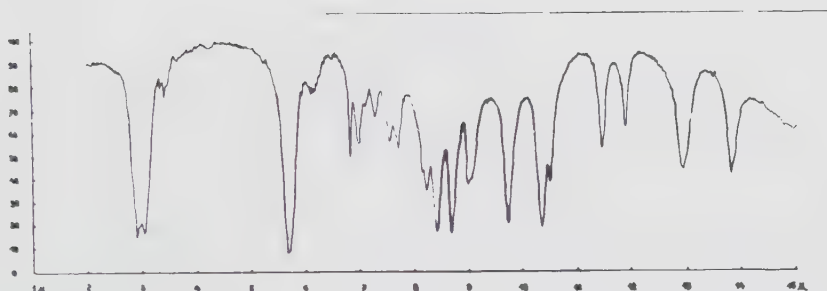


Figure 2 - Spectre infra-rouge de la α -D - érythrone lactone.

Méthode KBr. 2 mg de produit par g de KBr. Enregistrement : 1 minute/ μ
 Amplification : 6,2

Amortissement : 7,4. Prisme NaCl

Spectrographe I.R. Leitz Wetzlar n° 150

c) Vérification

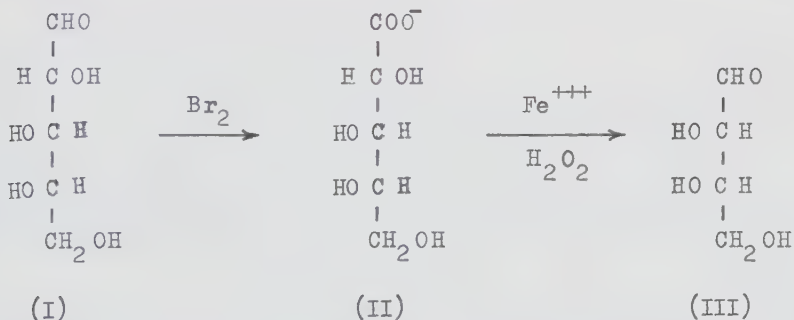
Soumise à l'analyse chromatographique, la D-érythro-nolactone ne donne qu'une tache dans tous les solvants utilisés. Après hydrolyse partielle par les alcalis dilués, on obtient par chromatographie deux taches, l'une possédant le même Rf que la tache initiale et donnant les réactions colorées des olides d'acide aldonique, l'autre (correspondant à l'acide érythrone) donnant les réactions colorées des acides aldoniques (cf. Tableau II)

Spectre I. R. - Le spectre I. R. (fig. 2) est tel qu'on peut le prévoir depuis la formule et présente le maximum d'absorption récemment indiqué par MITCHELL (97).

I₂ -2-3. Préparation du L-érythrose

Nous avons préparé du L-érythrose à partir du L-arabinose, produit commercialement accessible à bon compte, par la méthode générale de RUFF. (138, 139)

Dans un premier temps, nous passons du L-arabinose (I) au L-arabonate de calcium (II) par oxydation au brome et, dans un deuxième temps, le L-arabonate de calcium est transformé en L-érythrose (III) par action de peroxyde d'hydrogène et de sulfate ferrique.



a) Préparation du L-arabonate de calcium

46 g de L (+) arabinose en solution dans 230 ml d'eau sont additionnés de 31 g de brome et abandonnés 2 heures à la température du laboratoire avec agitation intermittente.

L'excès de Brome est chassé par un courant d'azote. L'acide bromhydrique est éliminé par de l'oxyde d'Argent. La

solution est filtrée et la faible quantité d'argent dissoute précipitée par H_2S . Le sulfure d'argent formé est éliminé par filtration et la solution additionnée à l'ébullition de carbonate de calcium en excès par petites portions. La solution filtrée, légèrement concentrée, laisse cristalliser par refroidissement le L - arabonate de calcium qui, après essorage et recristallisation, pèse environ 40 g.

b) Préparation du L-érythrose

Nous utilisons le mode opératoire de OVEREND et coll. (110) 3, 6 g. d'acétate de Baryum monohydraté dissous dans 10,5 ml d'eau et 1,78 g de sulfate ferrique dissous dans 10,5 ml d'eau sont introduits lentement, sous agitation constante dans 345 ml d'eau, par affusion de quantités égales des deux solutions.

Après élimination du sulfate de Baryum, la solution est amenée lentement à ébullition et 30 g de L-arabonate de calcium sont alors ajoutés par petites fractions. Le mélange est maintenu 20 minutes à l'ébullition et filtré sur charbon. Après refroidissement jusqu'à 40°, il est additionnée de 21 ml de peroxyde d'hydrogène à 100 volumes. La température s'élève à environ 60° et la solution brunit. Dès que la température est redescendue à 40°, on ajoute encore 21 ml de peroxyde d'hydrogène et on abandonne 12 heures à l'obscurité. Après ce temps, la solution est filtrée sur charbon, évaporée sous vide jusqu'au volume de 40 ml. Elle est alors traitée par 270 ml de méthanol; le précipité obtenu est éliminé par filtration, lavé par 55 ml de méthanol qui sont réunis au filtrat précédent. La solution méthanolique qui contient le L-érythrose est additionnée de 160 ml d'éther et filtrée après 5 minutes de contact.

Le filtrat, concentré sous le vide de la trompe à eau, puis sous vide profond, conduit au L-érythrose (environ 5 g) sous forme d'un sirop incristallisable réduisant lentement à froid et rapidement à chaud, la liqueur de Fehling.

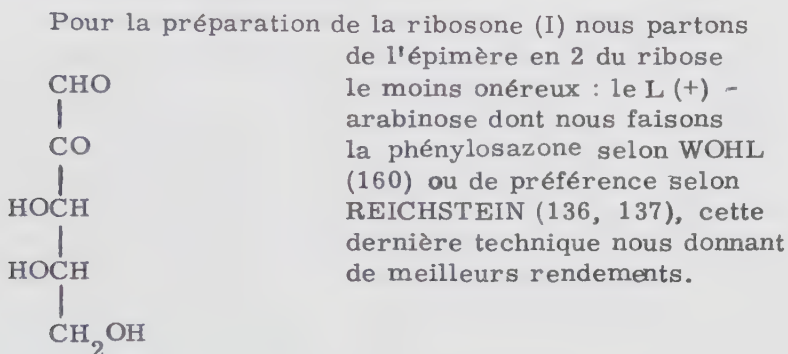
c) Vérification :

Chromatographie : le L-érythrose chromatographié dans différents solvants a les mêmes Rf qu'un échantillon de D-érythrose authentique.

Réduction : Par réduction au borohydrure de Sodium selon une technique décrite plus loin, nous obtenons de l'érythritol identifié par chromatographie sur papier.

Oxydation : En oxydant le L-érythrose par le brome selon une technique sensiblement identique à celle utilisée pour la synthèse de la D-érythronolactone, nous préparons de la L-érythronolactone cristallisée ayant les mêmes caractéristiques chromatographiques que la D-érythronolactone. La pureté du produit n'est sans doute pas parfaite car recristallisé dans l'acétate d'éthyle, il fond à 96° (théorie : 102°).

I₂-2-4 - Préparation de la L-ribosone = L-arabinosone = L-érythropentosulose.



(I)

Nous préparons ensuite l'osone depuis l'osazone par action du benzaldéhyde selon REICHSTEIN (136, 137).

A 18,8 g. de L-arabinosazone dans 2 l. d'eau et 310 ml d'alcool à 92° , ajouter 18,8 g. d'acide acétique et 30 g. de benzaldéhyde; Le mélange est disposé dans un ballon à fond rond, maintenu à l'ébullition sous reflux pendant 90 minutes et brassé énergiquement pendant toute l'opération au moyen d'un agitateur à joint de mercure.

Après refroidissement par de la glace le précipité est éliminé par filtration, la solution concentrée à 500 ml, décolorée sur charbon et évaporée sous vide. Le résidu est repris par l'alcool absolu pour éliminer les impuretés insolubles, le filtrat est évaporé sous vide et le résidu sirupeux porté sous vide (0,5 mm de mercure) pèse environ 2,8 g.

Vérifications :

Phénylhydrazine : la L-ribosone est précipitée à froid par la phénylhydrazine pour donner de la L - arabinosazone.

Chromatographie : la L-ribosone donne une tache unique dans les solvants utilisés. Elle est révélée spécifiquement par l'O-phénylènediamine et le 1-2-diamino-4-nitrobenzène.

I₂-2-5 - Tentative de préparation d'acide oxo-2- D-ribonique

Nous avons tenté de préparer de l'acide oxo-2-D-ribonique par oxydation par le brome de D-ribosone préparée selon une technique identique à celle utilisée pour la L-ribosone (I₂.2.4) Nous nous sommes inspirés des techniques de NEUBERG et KITASATO (104) et de GAKHOKIDZA (61).

Environ 2 g de D-ribosone sont dissous dans 100 ml d'eau, 2 g de brome sont ajoutés et la solution agitée 5 jours à la lumière du jour, à la température du laboratoire. L'excès de Brome est ensuite chassé par un courant d'azote, l'acide bromhydrique formé éliminé par du carbonate de plomb et l'excès de plomb éliminé par l'acide sulfhydrique. La solution est alors neutralisée à l'ébullition par du carbonate de calcium, filtrée, concentrée et additionnée d'alcool.

Il précipite 175 mg d'une poudre amorphe dont l'analyse chromatographique montre qu'elle est constituée surtout d'érythronate de calcium mais sans doute de faibles quantités d'oxo-2-ribonate de calcium. En effet, si l'acide libre obtenu par passage du sel de calcium sur résine Dowex 50 en cycle H⁺ est chauffé à 80° en milieu HCl 0, 1 N (conditions devant, selon REICHSTEIN (135), provoquer la transformation de l'acide oxo-2-ribonique en acide D-érythro ascorbique) on peut mettre en évidence par chromatographie, des traces d'un composé réduisant le 2 - 6-dichlorophénol-indophénol et donnant les réactions des lactones d'acide aldoniques. Ce composé doit être l'acide D-érythro-ascorbique dont REICHSTEIN (135) a préparé l'isomère L depuis l'adonose.

L'extrême labilité du composé explique le fait que nous n'ayons obtenu que des traces du produit.

I₂ - 3 - RESULTATS OBTENUS

Nous avons vérifié préalablement que l'on n'obtient aucune dégradation sensible du D-ribose par le peroxyde d'hydrogène à l'obscurité non plus que par irradiation U. V. de D - ribose pendant 6 heures en l'absence de peroxyde.

Par contre, lors de l'irradiation d'une solution de 1 mM de D-ribose et de 2 mM de peroxyde d'hydrogène dans 30 ml d'eau, la chromatographie sur papier met en évidence la formation de nouveaux produits.

Dans le solvant I (ButOH / AF/H₂O) notamment, qui permet une assez bonne résolution du mélange, nous obtenons 7 taches révélables par le réactif ferrocyanure-alun de fer. La position de ces taches que nous appellerons A, B, C, D, E, F, G est représentée sur la fig. 3.

Dans le but de préciser la nature des composés ainsi isolés nous avons également utilisé un certain nombre de réactifs de révélation. Quelques unes de ces données analytiques sont réunies dans le tableau I.

Parmi les 7 spots mis en évidence par la révélation ferrocyanure-alun de fer - par ordre décroissant d'importance : B, D, E, C, G, A, F, - quatre (A, C, E, G) sont révélés dès le premier stade de l'opération. Le caractère acide de ces quatre mêmes spots est démontré par la coloration rouge qu'ils prennent lorsque le chromatogramme est soumis à l'action du réactif de NORDMANN.

Le réactif hydroxylamine-FeCl₃, spécifique des olides dans les conditions utilisées, ne révèle que les spots D et F.

Par révélation au periodate-benzidine nous mettons en évidence 3 spots très importants (A, B, et C), les spots C, E, et F sont également apparents, seul le produit G n'est pas révélé.

Le phtalate d'aniline révèle surtout le produit B en brun rosâtre et fait apparaître une trainée de R_F supérieur.

Dans ces conditions de migration et de révélation, les produits majeurs de la dégradation semblent ainsi se répartir en :

- 3 dérivés possédant des propriétés d'acide à fonction glycol : Spots A, C et E (révélés en rouge par le réactif de

Techniques de révélation utilisées	Spots observés dans le système solvant I (ButOH/AF/H ₂ O)							Observations
	Spot A R _{Gl} = 0, 14	Spot B R _{Gl} = 0, 23	Spot C R _{Gl} = 0, 30	Spot D R _{Gl} = 0, 44	Spot E R _{Gl} = 0, 57	Spot F R _{Gl} = 0, 62	Spot G R _{Gl} = 1, 00	
- av. ammoniacque Ferrocyaneure-alun de fer	+(BV)		++(BV)		++(BV)		+(BV)	
- ap. ammoniacque	+(BV)	+++ (PV)	++(BV)	++(PV)	++(BV)	+(PV)	+(BV)	
Nordman	++(R)		++(R)	+(0)	++(R)	+(0)	++(R)	
Hydroxylamine - FeCl ₃				+++		+		
Periodate - benzidine	++	+++	+	+++	+	+		
Phtalate d'aniline		+++						On observe en outre une trainée de R _{Gl} > 0, 30

TABLEAU I : Mise en évidence de produits de dégradation du D-ribose soumis à une irradiation U.V. de 6 h. en présence de peroxyde d'hydrogène par l'application de diverses techniques de révélation à un chromatogramme développé par le système solvant I. Les symboles littéraux placés entre parenthèses indiquent la couleurs des spots : BV, bleu violacé, PV, pourpre-violacé, R, rouge, O, orangé. L'importance des spots est grossièrement exprimée par des croix.

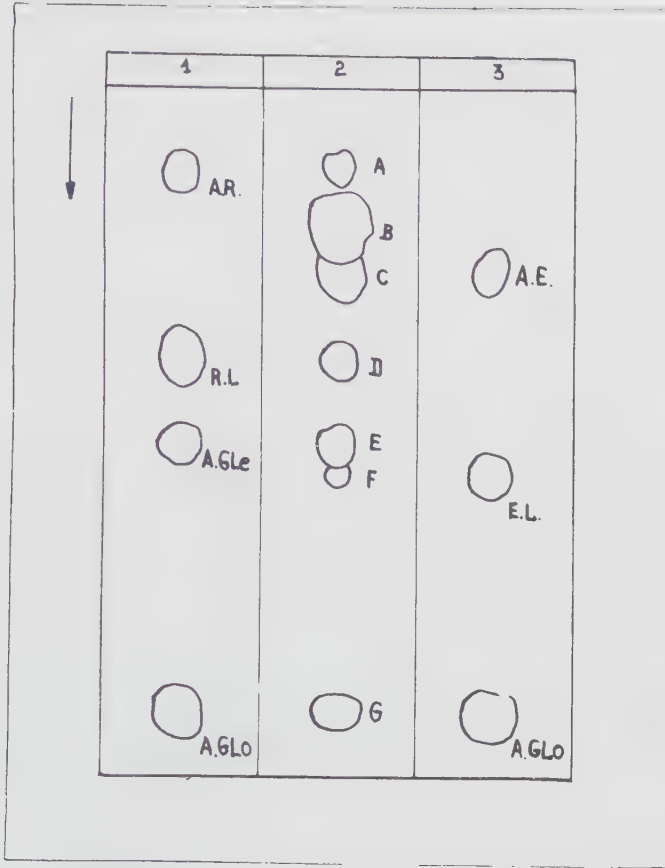


Figure 3 - Chromatographie à écoulement continu dans le système solvant I (ButOH/AF/H₂O). Révélation : ferrocyanure-alun de fer.

— bande 2 = produits de dégradation du D-Ribose. Les différents spots sont repérés par des lettres.

- bandes 1 et 3 : substances "témoins" (A.R. = Acide ribonique, R.L. = γ -D-ribonolactone, A.Glé = Acide glycérique, A.Glo = acide glycolique, A.E. = acide érythronique, E.L. = γ -D-érythronolactone).

NORDMANN, révélés par la réaction périodate-benzidine).

- 2 dérivés possédant des propriétés d'olides d'acides à fonction glycol, spots D et F, (révélés par le réactif hydroxylamine- FeCl_3 , révélés par la réaction périodate-benzidine).

- 1 dérivé possédant des propriétés d'acide ne comportant pas de fonction glycol : spot G (révélé par le réactif de NORDMANN, non révélé par la réaction périodate-benzidine).

- 1 dérivé possédant des propriétés de pentose, spot B (révélé en brun rósatre par le phtalate d'aniline, révélé par la réaction périodate-benzidine).

Indépendamment de ces produits de dégradation, l'utilisation d'autres réactifs de révélation permet de mettre en évidence des composés qui n'étaient révélés par le ferrocyanure-alun de fer que comme des trainées entre les spots nets mentionnés ci-dessus. C'est ainsi que par l'utilisation du réactif à l'ortho-phénylènediamine nous mettons en évidence une légère tache bleue entre les taches A et B, de même le réactif au DANB fait apparaître à cet endroit une tache jaune orangé ; ces taches correspondent à la coloration et au R_f de la ribosone. La révélation à la 2,4 -dinitrophénylhydrazine permet de mettre en évidence à ce niveau une tache orangée virant au violet par l'hydroxyde de sodium, et une trainée virant au brun par NaOH , de R_f supérieur à celui du ribose.

D'autre part, par révélation au naphtorésorcinol à froid, nous obtenons une trainée bleue située entre les taches B et E.

Pour préciser ces données, nous effectuons une chromatographie bidimensionnelle dans un système de deux solvants dont l'un est acide, le système I ($\text{ButOH}/\text{AF}/\text{H}_2\text{O}$) et l'autre alcalin, le système V ($\text{Et OH}/\text{NH}_4\text{ OH}/\text{H}_2\text{O}$). la première migration s'effectue dans le système I, en effet les solvants alcalins hydrolysant en partie les olides, ces composés donnent lieu à des phénomènes de trainée dont l'inconvénient est moindre s'ils se produisent pendant la deuxième migration. Par révélation au réactif ferrocyanure/alun de fer, nous obtenons un certain nombre de spots dont la position est représentée sur la fig. (4).

Le spot A s'est divisé en un spot très peu intense A_1 et un spot beaucoup plus important A_2 . Les spots du groupe B C¹ sont divisés en trois spots B C₁, B C₂, B C₃, le spot D divisé en un spot D et un spot D' reliés par une trainée. Les spots E, F et G sont restés homogènes.

Si l'on compare les R_{G1} et les colorations des produits obtenus à ceux des produits témoins (tableau II) on voit que nous pouvons provisoirement identifier

le spot A_2 à l'acide ribonique.

le spot B de la figure 3 au ribose.

le spot E à l'acide glycérique.

le spot G à l'acide glycolique.

Le spot D possède dans le premier solvant le R_{G1} de la ribonolactone et dans le solvant alcalin le R_{G1} de l'acide ribonique. De même, le spot F présente dans la première direction le R_{G1} de l'érythronolactone et dans la seconde celui de l'acide érythronique. La chromatographie bidimensionnelle dans ce système de solvants, d'échantillons purs de ribonolactone et d'érythronolactone montre que ces produits migrent en première dimension avec leurs R_{G1} caractéristiques, mais que, lors de la migration dans le solvant alcalin, ils s'hydrolysent en partie et présentent deux spots reliés par une trainée, correspondant l'un à la lactone, l'autre à l'acide libre. Ainsi la chromatographie de ribonolactone témoin fait apparaître deux spots ayant les mêmes R_{G1} que les taches D et D'. La chromatographie d'érythronolactone fait de même apparaître deux spots dont l'un présente les mêmes R_{G1} que le spot F. L'érythronolactone existant en faible quantité dans le mélange a migré dans la première dimension avec son R_{G1} de 0,62 mais est totalement et rapidement hydrolysée lors du développement par le deuxième solvant, dans lequel elle migre avec le R_{G1} de l'acide érythronique.

Ainsi dans ce système de solvants le mélange d'un acide aldonique et de l'olide correspondant (dans le cas d'acides pentoniques et tétroniques ne donnant qu'un olide) fournit 3 ou 2 spots selon que la qualité d'olide est importante ou faible. Dans le mélange analysé, les spots A_2 , D et D' peuvent être expliqués par la présence du couple acide ribonique - γ -ribonolactone et les taches BC_1 et F par la présence d'acide érythronique et d'érythronolactone.

La tache A_1 présente des vitesses de migration très voisines de celles de l'acide ribotrihydroxy-glutarique. Néanmoins cette tache ne correspond pas à cet acide; en effet, par migration de 32 heures dans le solvant V d'un mélange d'acide trihydroxy-glutarique et de la solution de produits de dégradation, on peut séparer l'acide ribotrihydroxyglutarique et la tache A_1 . Cette non-identité du spot A_1 et de l'acide ribotrihydroxyglutarique est confirmée par le fait que nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence de la lactone ribotrihydroxyglutarique.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Composés	$R_{Gl}^{syst. I}$ ($ButOH/AF$ $/H_2O$)	$R_{Gl}^{syst. II}$ $AcOE^+/$ $AcOH/H_2O$)	$R_F^{Syst. V}$ ($EtOH/NH_4$ OH/H_2O)	Révélation ferrocya- nure-alun de fer		Révélation hydro- xylamine- $FeCl_3$
Acide ribonique	0, 14	0, 39	0, 27	bleu -violet	bleu -violet	0
γ -Ribonolactone	0, 44	0, 86	0, 37 env.	0	pourpre- violacé	+
Acide érythrannique	0, 30	0, 56	0, 33	bleu-violet	bleu-violet	0
Erythronolactone	0, 62	0, 92	0, 43 env.	0	pourpre violacé	+
Acide ribotrihy- droxyglutarique	0, 12	0, 46	0, 05	bleu	bleu	0
Olide ribotrihydro- xyglutarique	0, 51	0, 65	0, 21	bleu-violet	bleu-violet	+
Acide glycérique	0, 57	0, 84	0, 34	bleu-violet	bleu-violet	0
Acide glycolique	1, 00	1, 00	0, 37	bleu-violet	bleu-violet	0
Acide glyoxylique	1, 22		Trainée 0-0, 27	violet- rouge	violet - rouge	0
Acide oxalique	Trainée 0 - 1, 08		0	bleu	bleu	0
Acide mésotar- trique	0, 17		0, 03	bleu	bleu-violet	0

Acide tartronique	0, 69		0, 09	bleu	bleu	0
Ribose	0, 23	0, 50	0, 51		pourpre violacé	0
Spot A (fig. 3)	0, 14		env. 0, 05 (A ₁)	bleu-violet	bleu-violet	0
		0, 39(A ₂)	0, 27(A ₂)	bleu-violet	bleu-violet	0
Spot B (fig. 3)	0, 23	0, 50		0	pourpre violacé	0
Spot BC ₁ (fig. 4)	0, 30	0, 56	0, 33	bleu-violet	bleu-violet	0
Spot D (fig. 3)	0, 44	0, 86	0, 27 (D)	bleu-violet	bleu-violet	0
			0, 37 (D')	0	pourpre violacé	+
Spot E (fig. 3)	0, 57	0, 84	0, 34	bleu-violet	bleu-violet	0
Spots F (fig. 3)	0, 62	0, 92	0, 33	*	*	*
Spot G (fig. 3)	1, 00	1, 00	0, 37	bleu-violet	bleu-violet	0

(*) se révèle comme un acide carboxylique dans le solvant alcalin (système V) et comme un olide d'acide aldonique dans les solvants acides (systèmes I et II)

TABLEAU II : Chromatographies de substances "témoins" et de produits de dégradation du D-ribose.

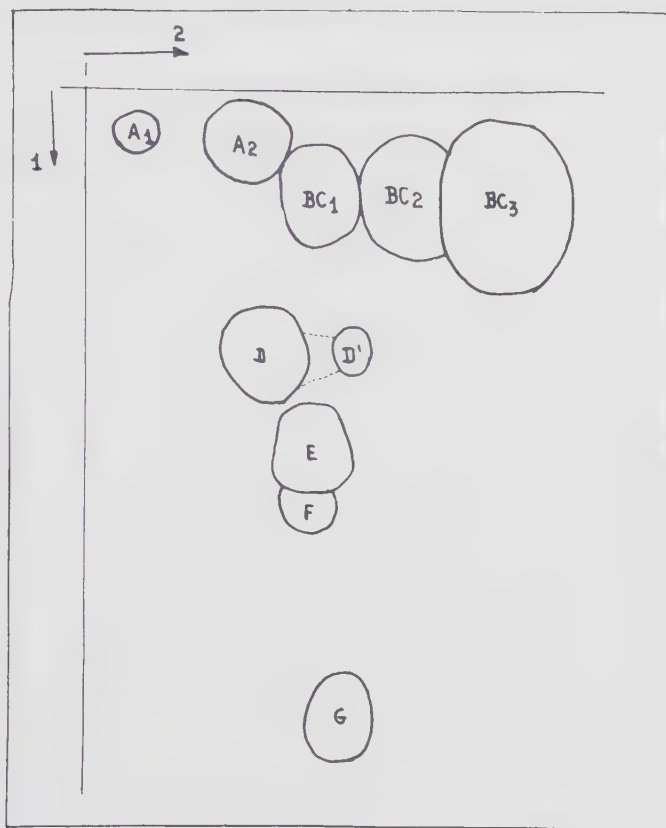


Figure 4 - Chromatographie bidimensionnelle des produits de dégradation du D - ribose.

En première dimension : système solvant I (ButOH/AF/H₂O)

En seconde dimension : système solvant V (EtOH/NH₄OH/H₂O)

En conclusion, l'étude chromatographique du mélange des produits de dégradation du D-ribose permet de prouver l'absence d'acide ribotrihydroxyglutarique et d'admettre provisoirement, la présence des acides ribonique, érythronique, glycérique et glycolique et des lactones ribonique et érythronique.

Dans le but de vérifier ces résultats, nous divisons par l'emploi de résines échangeuses d'ions, le mélange complexe de ces produits de dégradation en deux fraction :

une fraction "acide" et

une fraction "neutre", d'une étude plus aisée.

oOo

1₃ - SEPARATION DES PRODUITS DE DEGRADATION D D- RIBOSE EN UNE FRACTION "ACIDE" et UNE FRACTION "NEUTRE".

Dans le but, d'une part, de vérifier le caractère acide d'une partie des produits obtenus et d'autre part, d'obtenir des mélanges moins complexes, d'une étude plus aisée, nous séparons les produits de dégradation du ribose en une fraction "neutre" et une fraction "acide" à l'aide d'une résine échangeuse d'anions DOWEX 2 x 8 (50 - 100 mesh).

- Préparation de la résine :

30 g de résine abondamment lavée à l'eau distillée sont disposés dans une colonne de verre de 480 mm de hauteur et de 15 mm de diamètre, munie à sa partie inférieure d'un siphon prévenant la dessiccation de la résine et à sa partie supérieure d'une ampoule à décantation par laquelle sont introduits les solvants. Pour limiter le risque d'épimérisation des sucres, nous utilisons cette résine en cycle formiate.

La résine est d'abord activée par passage successif de :

- 60 ml d'HCl N
- 300 ml d'H₂O
- 60 ml de NaOH, 0,5 N
- 300 ml d'H₂O

L'opération est effectuée 3 fois.

La résine est ensuite mise en cycle formiate par passage de 600 ml de formiate de sodium N puis lavée par deux litres d'eau distillée.

- Fixation des anions sur la colonne :

Avant passage sur colonne nous hydrolysons les lactones, en effet, ces composés se distribuent entre les deux fractions. Pour ce faire, la solution est maintenue à pH 9 pendant une demi-heure, neutralisée, puis passée immédiatement après sur la colonne.

Par élution avec 600 ml d'eau, nous obtenons la fraction "neutre" qui est ensuite désionisée par passage sur résine DOWEX 50 forme H⁺, lorsque cette désionisation est indispensable, puis évaporée à 30-40° dans un évaporateur rotatif sous vide.

- Elution des acides :

Nous éluons les acides par passage sur la colonne de 80 ml d'acide formique 6 N selon (108) (*).

Nous recueillons le liquide d'élution dès que sa réaction est acide. Il constitue la fraction "acide" qui est évaporée sous vide à 30-40°.

- Régénération de la résine :

La résine est lavée sur la colonne par 600 ml d'eau distillée et régénérée par passages successifs de :

- 40 ml de formiate de sodium 3 N
- 600 ml d'eau distillée
- 300 ml d'acide formique 6 N
- 1,5 l d'eau distillée.

I₃-1 - Analyse qualitative de la fraction "acide"

I₃-1-1 : Etude de la fraction "acide" par chromatographie sur papier.

La fraction "acide" soumise à la chromatographie monodimensionnelle dans le solvant I (n butanol /AF/ H₂O) fait apparaître les taches A C D E F G déjà rapportées à des acides ou à leurs olides. Par chromatographie dans le solvant II (AcoEt /AcOH/H₂O) nous obtenons également une bonne résolution, à cela près que l'acide glycérique et la ribonolactone ont des R_{G1} presque identiques. Nous obtenons une bonne séparation en combinant par chromatographie bidimensionnelle, le solvant I (qui sépare mal l'érythronolactone et l'acide glycérique) en première dimension et le solvant II (qui sépare mal l'acide glycérique et la ribonolactone) en seconde dimension.

La révélation spécifique des lactones fait apparaître sur le chromatogramme les taches D' et F' correspondant respectivement à la ribonolactone et à l'érythronolactone (fig. 5). Le même chromatogramme est révélé ensuite au réactif ferrocyanure-alun de fer qui fait apparaître de nouvelles taches : les taches A₂, BC₁, E et G correspondant respectivement aux acides

(*) nous avons vérifié que, dans ces conditions, tous les acides organiques du milieu étaient bien élués (100 ml d'acide formique N sont d'ailleurs suffisants pour réaliser cette opération).

ribonique, érythronique, glycérique et glycolique. Il existe une trainée au niveau des produits de bas R_T .

L'étude chromatographique de la fraction "acide" permet donc de mettre en évidence les produits majeurs suivants :

- acide ribonique et ribonolactone
- acide glycérique
- acide glycolique
- acide érythronique et érythronolactone

L'identification de ces produits a été réalisée surtout par l'emploi des systèmes solvants I, II et V mais accessoirement des systèmes III, IV et VII. Ces résultats sont confirmés par des expériences de "surcharge": un témoin interne, acide glycolique, glycérique, érythronique ou ribonique est ajouté à la fraction "acide"; ces témoins ne peuvent être séparés des composés correspondants.

La relative simplicité de la fraction "acide" préparée par l'utilisation de la résine échangeuse d'ions rend possible l'obtention, par élution depuis le chromatogramme, de solutions très diluées mais pures des différents produits de dégradation.

Cette technique d'élution nous permet de vérifier les déterminations des couples acide aldonique-olide correspondant en procédant à la lactonisation de l'acide libre élué du chromatogramme et à l'hydrolyse de l'olide obtenu de la même façon.

Un échantillon de la fraction "acide" déposé sur la feuille de papier Whatman n° 1 selon une ligne parallèle au bord supérieur de la feuille est soumis à la chromatographie dans le système solvant I. Après migration, nous révélons une bande verticale de la feuille et découpons dans la partie non révélée des bandes horizontales en regard des acides ribonique et érythronique et de leurs lactones. Par élution à l'eau distillée des produits se trouvant sur ces bandes, nous obtenons des solutions pures de ces corps.

Les solutions des acides ribonique et érythronique sont amenées à pH 2 à l'aide d'acide chlorhydrique N et maintenues une demi-heure au bain-marie à 80°, de façon à lactoniser partiellement ces acides. Les solutions ainsi obtenues sont rechromatographiées dans les systèmes solvants I et II. On obtient depuis les acides érythronique et ribonique des composés ayant respectivement les caractères (R_{G1} et coloration) de l'érythronolactone

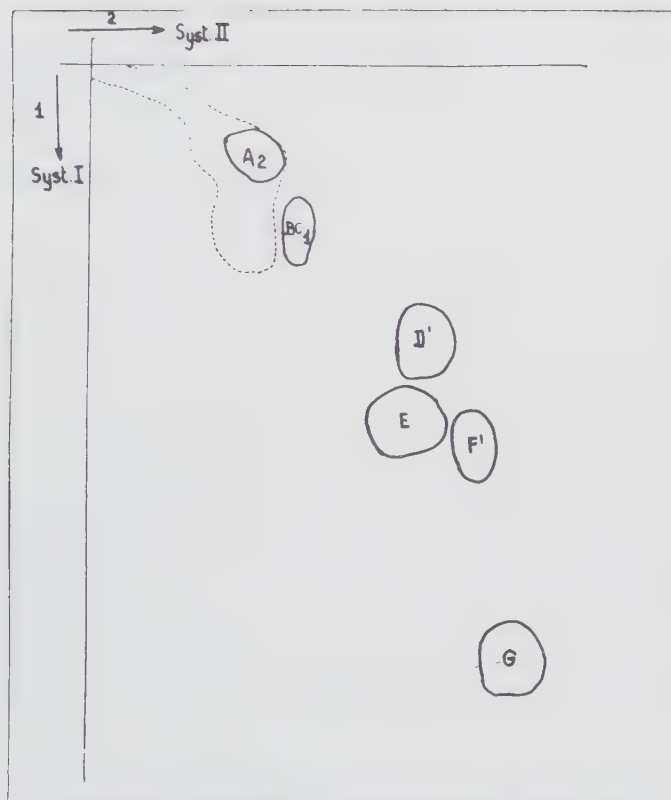


Figure 5 - Chromatographie bidimensionnelle de la fraction "acide" des produits de dégradation du D - ribose.

En première dimension : système solvant I (ButOH/AF/H₂O)

En seconde dimension : système solvant II (AcOEt/AcOH/H₂O)

et de la ribonolactone. De même, les solutions de ribonolactone et d'érythronolactone obtenues par élution sont maintenues une demi-heure à pH 9. Les olides ainsi hydrolysés sont rechromatographiés dans les systèmes I et II. On obtient, depuis la ribonolactone et l'érythronolactone, des composés ayant respectivement les caractéristiques de l'acide ribonique et de l'acide érythrannique. On peut admettre que la présence des acides ribonique et érythrannique (mise en évidence par chromatographie dans au moins quatre solvants et par intertransformation acide-olide) est prouvée sans ambiguïté.

I₃-1-2 Chromatographie de la fraction "acide" sur colonne d'acide silicique

Nous soumettons la fraction "acide" à une séparation chromatographique sur colonne d'acide silicique d'après une technique inspirée de celle de BULEN et coll. (26).

Nous utilisons de l'acide silicique MALLINKRODT 100 mesh, desséché 4 heures à 100°, et une série de solvants obtenus par mélange de chloroforme fraîchement distillé et de n-Butanol en proportions croissantes (5 %, 15 %, 25 %, 35 % et 50 % de n-Butanol en volumes). Ces solvants sont, immédiatement avant usage, agités avec 1/10 de leur volume d'acide sulfurique 0,5 N, décantés et filtrés. On introduit dans la colonne (hauteur : 450 mm, diamètre: 15 mm) 5 g d'acide silicique en suspension dans le solvant chloroforme à 5 % de n-butanol. La fraction acide concentrée à environ 1 ml est adsorbée sur 2 g d'acide silicique qui sont introduits à la partie supérieure de la colonne.

L'analyse chromatographique est effectuée à l'aide des différents mélanges chloroforme-n-butanol utilisés successivement, dans l'ordre des proportions de n-butanol croissantes. Nous réglons le débit à environ 10 gouttes par minute au moyen d'une pression réglable d'air comprimé appliquée au sommet de la colonne. Nous recueillons le liquide d'élution par fractions de 5 ml à raison de 12 ou 13 fractions pour chacun des solvants.

Dans chacune des fractions ainsi obtenues nous dosons l'acidité libre par la soude N/100 après addition de 2-3 ml d'eau et de quelques gouttes de rouge de Phénol. En portant en abscisses le numéro des différentes fractions et en ordonnée l'acidité libre de chacune d'entre elles (en μ Eq) nous obtenons un tracé représenté fig. 6 où l'on reconnaît la présence de 3 pics importants, I, II et III.

Le pic I correspond à l'acide formique utilisé lors de l'élution de la colonne de DOWEX 2. Les pics II et III correspondent à des produits s'éluant dans les mêmes conditions que de l'acide glycolique témoin - pour le pic II - et de l'acide glycérique témoin - pour le pic III - (fig. 6).

Après le dosage acidimétrique, les différentes fractions correspondant au pic II sont rassemblées. La couche aqueuse est recueillie, passée sur résine DOWEX 50 forme H^+ pour éliminer les ions Na^+ , concentrée, et la solution obtenue chromatographiée dans les solvants I et IV en présence d'acide glycolique comme témoin. Le produit correspondant au pic II et l'acide glycolique témoin ont les mêmes caractéristiques chromatographiques. Nous vérifions de plus qu'il est impossible de séparer leur mélange par analyse chromatographique.

De même, un traitement analogue du produit du pic III montre qu'il possède toutes les caractéristiques chromatographiques de l'acide glycérique.

Ainsi, la présence parmi les produits de dégradation du D-ribose sous l'effet des radicaux libres hydroxyles, d'acide glycolique et d'acide glycérique, présence mise en évidence par chromatographie sur papier dans au moins 4 solvants et par chromatographie sur colonne d'acide silicique, peut être considérée comme établie sans ambiguïté.

I₃-I-3 : Recherche d'acides oxo-aldoniques

Nous avons tenté de mettre en évidence dans la fraction "acide" la présence d'acides oxo-aldoniques et en particulier d'acide oxo-2-ribonique dont la formation peut être envisagée par oxydation de la ribosone. Nous avons utilisé pour cela plusieurs techniques.

Les acides oxo-riboniques sont encore très peu connus mais il semble hautement probable qu'ils se lactonisent facilement comme les acides oxo-hexoniques. Or, lorsque la fraction "acide" est lactonisée par chauffage d'une demi-heure à pH 2, au bain-marie à 80°, on obtient effectivement lors de la révélation au réactif d'ABDEL AKHER et SMITH (1) des spots plus importants de γ -ribonolactone et d'érythroneolactone mais ces deux spots sont les seuls spots nettement révélés, ce qui semble exclure la présence de quantités notables d'autres acides susceptibles de se lactoniser.

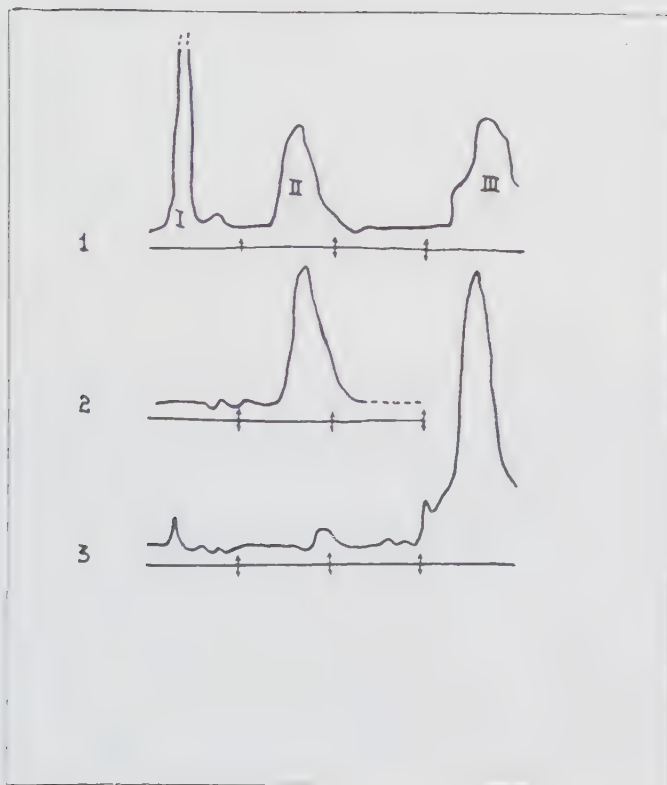


Figure 6 - Chromatographie sur colonne d'acide silicique de la fraction "acide" des produits de dégradation du D-ribose.

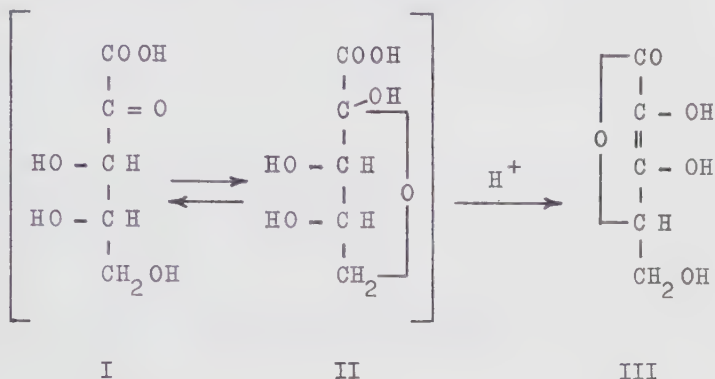
En ordonnée : acidité dosée,

En abscisse : numéros des fractions de 5 ml recueillies. L'intervalle compris entre deux des doubles flèches successives figurées sur l'axe des abscisses correspond à l'un des solvants utilisés donc à 12 fractions de 5 ml. Les espaces ainsi déterminés par ces doubles flèches correspondent de la gauche vers la droite aux solvants à 15, 25, 35 et 50 % de n-butanol.

La courbe 1 correspond à la chromatographie de la fraction "acide".

Les deux autres courbes correspondent à des chromatographies de substances "témoins" : acide glycolique (courbe 2), acide glycérique (courbe 3).

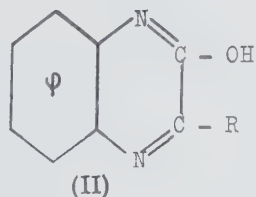
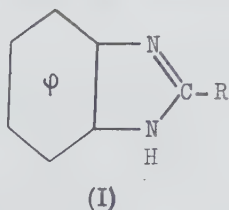
En ce qui concerne les acides oxo-2-aldoniques REI - CHSTEIN (135) a montré d'ailleurs, que dans ces conditions de pH et de température, l'acide oxo-2-L-ribonique (I et II) se transformait en un homologue inférieur de l'acide ascorbique, l'acide L-érythroascorbique (III), selon la réaction :

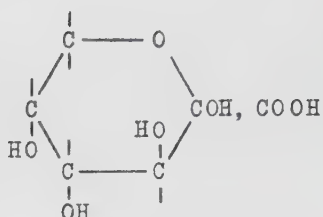


Ce composé possédant une fonction lactone et un groupement énediol peut être mis en évidence par chromatographie en utilisant les révélations caractéristiques de l'une ou l'autre de ces fonctions. La fraction "acide" maintenue une heure au bain-marie bouillant en milieu HCl 0,05 N et chromatographiée dans le solvant I en atmosphère saturée d'HCN, est révélée au 2-6-dichlorophénol-indophénol et au réactif d'ABDEL AKHER et SMITH. Elle ne présente aucun spot réduisant le premier réactif et aucune tache nouvelle se révélant par le deuxième réactif. Par contre, traité dans les mêmes conditions, l'acide céto-2-ribonique que nous avons préparé présente une tache de $R_{\text{Cl}} 0,75$ environ dans le système I, révélable par les deux réactifs, et qui doit sans doute être rapportée à la formation d'acide érythroascorbique.

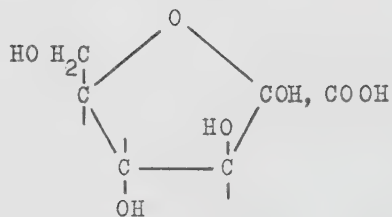
- Réaction avec l'ortho-phénylène diamine :

Alors que sous l'action de l'ortho-phénylènediamine les acides aldoniques ne sont convertis en benzimidazols (I) qu'à 120-150° et en milieu fortement acide, les acides oxo-2-hexoniques bien qu'ils ne comportent pas de fonction carbonyle (cf. formule de l'acide oxo-2-gluconique III et IV) sont convertis en hydroxyquinoxalines (II) beaucoup plus facilement - à la température ambiante (86, 114).





(III)



(IV)

Cette réaction, utilisée pour révéler les chromatogrammes (86) fait apparaître les acides oxo-2-aldoniques comme des taches gris-vert ou fluorescent en gris-vert, fait que nous avons vérifié dans le cas de l'acide oxo-2-gulonique. La technique appliquée à la fraction "acide" ne fait apparaître aucune tache de ce genre. Par contre, lors de l'action de radicaux libres hydroxyles obtenus par photolyse du peroxyde d'hydrogène sur la ribonolactone, nous obtenons une légère tache gris-vert fluorescent dont le R_{GI} dans le système I (n butOH/AF/H₂O) est d'environ 0,24.

- Réaction avec le 1-2-diamino-4-nitrobenzène :

Ce réactif, utilisé par HOCKENHULL et FLOODGATE pour la caractérisation d' α -cétoacides de la série grasse, ne nous permet pas non plus de mettre en évidence la présence d'acides oxo-2-aldoniques.

Nous pouvons donc admettre qu'il n'existe pas dans la fraction "acide" de quantités notables d'acides oxo-aldoniques.

I₃-1-4 - Recherche des acides "uroniques"

Sur les chromatogrammes de la fraction "acide" traités à froid par le réactif au naphtrésocinol, il apparaît des colorations bleues se développant à la température du laboratoire, en une demie-heure au minimum et en deux heures au maximum.

Dans le système I nous obtenons une tache unique allongée entre les R_{Gl} 0,27 et 0,43. Le système II permet de mettre en évidence 2 taches, l'une entre les R_{Gl} 0,14 et 0,27, l'autre, plus importante, entre les R_{Gl} 0,31 et 0,52.

Par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes I (en première dimension) et II (en seconde dimension) et révélation par le réactif au naphtorésorcinol, puis par le réactif ferrocyanure-alun de fer, nous mettons en évidence les deux faits suivants :

- les deux composés se révélant par le réactif au naphtorésorcinol ne correspondent pas à l'un des composés majeurs précédemment mis en évidence.

- ces composés ne sont que très faiblement révélés par le réactif au ferrocyanure-alun de fer ce qui implique qu'ils n'existent qu'en faible quantité dans le milieu.

La révélation au naphtorésorcinol dans les conditions où nous l'avons pratiquée est réputée être spécifique des acides uroniques encore que les acides oxo-2-hexoniques la donnent faiblement (*)

Lorsque nous soumettons à l'analyse chromatographique les fractions "acide", obtenues depuis les produits d'irradiation croissante du D-ribose en présence de peroxyde d'hydrogène (1 h, 2h 10 h.) nous remarquons que pour de faibles irradiations les quantités d'acides révélables par le naphtorésorcinol sont très faibles, qu'elles augmentent avec la durée d'irradiation, lentement d'abord puis très rapidement quand celle-ci est supérieure à 6 h.

La présence d'acides uroniques est mise en évidence également sur la fraction "acide" correspondant à des irradiations

(*) Il est admis que les colorations obtenues par l'application de cette technique de révélation aux acides uroniques sont dues à la formation de furfural depuis ces corps. Or, des composés comme l'érythrose dont il est difficile d'admettre qu'ils puissent engendrer du furfural, donnent la coloration à chaud. Les dérivés acides de dégradation du D-ribose donnant cette coloration à froid pourrait être des acides uroniques ou oxoaldoniques à 5 carbones qui donneraient plus facilement que l'érythrose lui-même, le dérivé responsable de la coloration (phénomène analogue à celui qui a lieu pour les acides hexuroniques qui engendrent plus facilement du furfural que les pentoses correspondants).

tions de plus de 6 heures, en effectuant la réaction au naphtorésorcinol selon LEFEVRE et TOLLENS d'après ASHWELL (in 35). On obtient un composé coloré dont la courbe d'absorption présente un maximum à $590 \text{ m}\mu$ (acides hexuroniques: $570 \text{ m}\mu$).

Le composé coloré obtenu par la réaction au carbazole de DISCHE d'après ASHWELL (in 35) a un maximum d'absorption situé à $480 \text{ m}\mu$ (maximum $530 \text{ m}\mu$ pour les acides hexuroniques).

La faible quantité de produit que nous avons pu obtenir par élution depuis une chromatographie dans le système I ne nous a pas permis d'obtenir de résultats nets par réduction au borohydrure de sodium selon une technique inspirée de HOGENKAMP et coll (72, 73) et d'ASHWELL et coll (4).

Par dégradation du D-ribose on obtient donc de faibles quantités de composés acides ayant des propriétés d'acides uroniques.

oOo

L'attaque du D-ribose par des radicaux libres hydroxy-les engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène amène la formation d'un certain nombre d'acides : ribonique, érythronique, glycérique, glycolique et de lactones : γ -ribonolactone, et érythronolactone. Il apparaît également des acides se colorant en bleu à froid par le naphtorésorcinol et en petite quantité des acides non déterminés à faible vitesse de migration dans les solvants I et II, certains d'entre eux, d'une mobilité presque nulle, étant peut être des composés polymérisés. Les acides trihydroxyglutarique, oxalique, mésotartrique, glyoxylique, tartronique ne sont pas obtenus.

L'étude chromatographique de fractions "acides" de D-ribose soumis à des irradiations de durée croissante montre que pour de faibles durées d'irradiation il se forme surtout de la ribonolactone et de l'acide ribonique puis de l'acide glycérique et de l'acide glycolique enfin de l'acide érythronique et de l'érythronolactone.

Des acides colorants en bleu le naphtorésorcinol apparaissent en très petite quantité lors des faibles irradiations puis les quantités augmentent rapidement pour des irradiations d'énergie supérieure à 0,8 millieinstein.

Pour déterminer si la formation de ribonolactone est le seul mécanisme primaire, nous soumettons de la γ -D-ribonolactone à l'irradiation U. V. en présence de peroxyde d'hydrogène dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'attaque du D-ribose. Si la formation de ribonolactone était le seul mécanisme pri-

maire, son irradiation conduirait aux mêmes produits de dégradation que le D-ribose et dans les mêmes proportions. Or il se forme un composé de $R_{G1} 0,24$ dans le système I, fluorescent en gris verdâtre, cette tache fluorescente caractérisant la présence d'un acide 2-oxoaldonique qui n'est pas obtenu lors de la dégradation du D-ribose.

De plus :

1) la ribonolactone semble beaucoup plus résistante à l'action des radicaux libres hydroxyles que le D-ribose et,

2) sa dégradation ne fournit que de faibles quantités d'acide glycérique ce qui tend à prouver que la ribonolactone n'est pas la voie unique de dégradation du D-ribose mais que la formation de ce corps ne constitue qu'un des mécanismes primaires de la dégradation du D-ribose par les radicaux libres hydroxyles.

I₃-2 - Etude qualitative de la fraction "neutre"

I₃-2-1 - Etude de la fraction "neutre" par chromatographie sur papier.

La fraction "neutre" correspondant à une irradiation de six heures, après désionisation éventuelle par passage sur résine DOWEX 50 en cycle H^+ est concentrée et chromatographiée dans les systèmes solvants I, VI, et VII

La révélation au phtalate d'aniline fait apparaître un seul spot net, celui du ribose en excès et une légère trainée au niveau de l'érythrose.

La révélation à l'o-phénylènediamine permet de mettre en évidence la présence de traces de ribosone se colorant en bleu, ainsi que celle d'un autre composé prenant la même couleur.

La révélation à la 2-4-dinitrophénylhydrazine fait apparaître dans le système I une trainée présentant un épaississement au niveau de la ribosone et devenant peu importante au niveau des produits de mobilité supérieure à celle de l'érythrose.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau III. On trouvera dans le tableau IV les R_R des différentes substances "témoins" utilisées.

L'analyse chromatographique de cette fraction "neutre" met donc en évidence l'existence d'une importante quantité de ribose non dégradé, la présence de traces de ribosone, d'érythrose et de composés aldéhydiques ou cétoniques de grande mobilité. Le tableau montre que la séparation chromatographique de ces composés carbonylés à faible condensation en carbone est difficile dans les conditions utilisées. Nous avons donc tenté de déterminer la composition de la fraction "neutre" en utilisant d'autres techniques que la simple chromatographie sur papier.

I₃-2-2 : Action de la 2-4-dinitrophénylhydrazine

La fraction "neutre" précipite immédiatement quand elle est traitée à froid par une solution saturée de 2-4-dinitrophénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 2N selon une technique utilisée par NEISH (103) pour la séparation d' α -cétoacides. Le précipité obtenu est un mélange de mono-et de bis-2-4-dinitrophénylhydrazones qui se prête mal à l'analyse chromatographique.

I₃-2-3 : Action du 1-2-diamino-4-nitrobenzène

La fraction "neutre" traitée par le DANB en solution à 0,2 % dans l'acide chlorhydrique 0,66 N se colore immédiatement en rouge-orangé puis précipite (comme le font les solutions de ribosone). La chromatographie dans les solvants V, III, et VI du précipité obtenu permet de mettre en évidence un certain nombre de dérivés du DANB dont l'un présente la fluorescence rouge et les R_F du composé obtenu en traitant dans les mêmes conditions de la ribosone par le DANB.

I₃-2-4 : Réduction de la fraction "neutre".

La fraction "neutre" est réduite par le borohydrure de sodium selon une technique inspirée de celles de HOGENKAMP et coll (72, 73) et de ASHWELL et coll. (4). Le dixième environ de la fraction "neutre" est amené par de l'eau distillée à un volume de 2-3 ml et maintenu une demie-heure avec 30 mg de borohydrure de sodium. Après ce temps, le borohydrure en excès est détruit et les cations Na⁺ éliminés par addition de résine DOWEX 50 en cycle H⁺ et d'une à deux gouttes d'acide chlorhydrique N. Après filtration, le liquide est évaporé à sec et repris par 20 ml de méthanol qui sont évaporés sous un courant d'air chaud. Cette dernière opération, répétée trois fois, a pour effet d'éliminer les anions borates par distillation du borate de méthyle. Le résidu de réduction est repris par quelques gouttes de méthanol, chromatographié dans les solvants III et VI en présence de témoins (ribi-

Techniques de Révélation utilisées			
Phtalate d'aniline			1,00 brun violacé
o-phénylène diamine		Bleu violet	
2-4-dinitro- phénylhydrazine		Jaune orangé	
puis hydroxyde de sodium		Bleu violet	

TABLEAU III : Schéma en forme de tableau des résultats de révélation
d'irradiation: 6 h, dans le système solvant I (nButOH/AF/H₂O)

La partie droite du tableau représente la position et les colorations de
de la gauche vers la droite.

R_R	
2,00	3,00
trainée jaune brun	trainée jaune brun clair
Spot bleu violet inconstant	
Trainée jaune orangé	
Trainée jaune orangé	

i de chromatographies de la fraction "neutre" (durée

s différents spots, les vitesses de migrations croissant

Composés	R_R Système I (nButOH-AF- H ₂ O)	R_R Système VI (nButOH-EtOH - H ₂ O)	R_R Système VII (n ButOH-Py- ridine-H ₂ O)
Ribose	1, 00	1, 00	1, 00
Ribosone	Trainée: 0, 2-1, 10	Trainée 0, 80	0, 92
Erythrose	Trainée : 1, 4-2, 2	1, 43	1, 15
Glycéral- déhyde	Trainée : 1, 6-3, 3		Trainée : 1, 20
Dihydroxy- acétone	2, 7		1, 18

TABLEAU IV - R_R des substances "témoins" utilisées pour l'étude chromatographique de la fraction "neutre".

Composés	R_F Système VI (nbutOH-EtOH -H ₂ O)	R_F Système III (nButOH-AcOH - H ₂ O)
Adonitol (Ribitol)	0,28	0,25
Erythritol	0,31	0,35
Glycérol	0,37	0,48
Ethylèneglycol	0,61	0,64

TABLEAU V : R_F (dans les systèmes solvants VI et III)
des substances témoins utilisées lors des expériences de
réduction de la fraction "neutre".

tol, érythritol, glycérol, éthylène-glycol)(cf. tableau V) et les chromatographies révélées au réactif de GODIN et au réactif periodate-benzidine. On peut ainsi mettre en évidence la présence de ribitol et d'érythritol.

I₃-2-5 : Oxydation de la fraction "neutre"

La fraction "neutre" est maintenue au contact d'eau de brome 12 heures à l'obscurité, à la température du laboratoire. Dans ces conditions, seuls les groupements aldéhydes sont oxydés en groupements carboxyliques. La solution obtenue, débarrassée de l'excès de brome par un courant d'azote et des anions bromure par de l'oxyde d'argent est divisée en une fraction "acide" et une fraction "neutre" selon la technique décrite plus haut. L'analyse chromatographique de la fraction "acide" montre que celle-ci contient de la ribonolactone, de l'acide ribonique, de l'acide glycolique, de l'acide glycérique et des traces d'acide érythronique et d'érythronolactone.

oOo

Sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène, le D-ribose est profondément dégradé avec formation d'un certain nombre d'acides et de produits "neutres".

Il semble qu'il existe plusieurs mécanismes de dégradation contemporains. Par utilisation de techniques mettant en jeu des molécules marquées nous allons tenter de préciser le mécanisme de cette dégradation.

oOo

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DU MECANISME DE LA DEGRADATION
DU D-RIBOSE SOUS L'ACTION DE RADICAUX LIBRES
HYDROXYLES ENGENDRES PAR PHOTOLYSE
DU PEROXYDE D'HYDROGENE

La première partie de ce travail nous a permis de déterminer qualitativement les composés formés et de préciser, en utilisant des molécules "froides", les conditions optimales d'analyse. Les enseignements qui en ont été tirés sont utilisés dans cette deuxième partie à la mise en oeuvre de techniques plus quantitatives, tout particulièrement de techniques faisant intervenir des molécules marquées.

oOo

II₁ - DOSAGE VOLUMETRIQUE DE L'ACIDITE APPARUE

Nous soumettons à l'irradiation 50 ml d'une solution aqueuse de D-ribose (0,033 M/l) et de peroxyde d'hydrogène (0,066 M/l). Des prélèvements sont effectués toutes les heures pendant les 6 heures d'irradiation et l'acidité libre y est dosée par l'hydroxyde de sodium N°100 en présence de rouge de phénol comme indicateur. L'acidité totale est également déterminée en maintenant des aliquotes de chacun des échantillons en présence d'un excès d'hydroxyde de sodium N°100 pendant une demie-heure puis en dosant l'excès d'hydroxyde de sodium par de l'acide sulfurique N°100. Dans ces conditions les olides présents sont hydrolysés quantitativement.

Les résultats sont représentés sur la figure 7 où sont portés en abscisses l'énergie lumineuse reçue par la solution et en ordonnée les quantités d'acidité libre et totale formées.

On en déduit que la formation d'acides est un mécanisme primaire. Pour des durées d'irradiation inférieures à 5 heures la quantité d'acides libres formée est directement proportionnelle à l'énergie lumineuse reçue.

Le rendement quantique :
$$\frac{\text{Quantité d'acide (mEq)}}{\text{Nh}\gamma \text{ (mEinstein)}}$$

étant égal à 0,75, la courbe représentant la variation de l'acidité totale en fonction du temps est plus complexe. Sa pente est d'abord supérieure à celle de la courbe correspondant aux variations de l'acidité libre, les deux courbes ne tendant à devenir parallèles que pour les irradiations d'une énergie au moins égale à 0,715 millieinstein.

II₂ - ESSAIS A L'AIDE DE MOLECULES MARQUEES

II₂-1 : Appareillage :

Nous utilisons un ensemble de marque TRACERLAB comportant :

- une alimentation haute tension
- un compteur de GEIGER-MULLER TGC 14 à fenêtre de "MYLAR" enfermé dans un château de plomb,
- un passeur automatique de bandes,
- une échelle de comptage avec préamplificateur,
- un chronographe imprimant,

Le palier du compteur de GEIGER-MULLER est déterminé selon la technique habituelle et nous fixons la tension d'utilisation à 1180 volts, valeur du demi-palier.

Les bandes de papier supportant les composés radioactifs sont fixées sur le passeur automatique. Sous la fenêtre du compteur est disposé un écran ménageant une fente dont la grande dimension est perpendiculaire à l'axe de la bande et dont nous réglons la largeur à 5 mm. Le compteur mesure donc la radioactivité d'une fraction de la bande de 5 mm de largeur. Après enregistrement d'un nombre de coups prédéterminé - 1000 en général -, l'appareil note le temps nécessaire pour les obtenir, se remet au zéro et le passeur automatique fait avancer la bande de 5 mm présentant ainsi à l'exploration une nouvelle portion de celle-ci. Les bandes soumises à l'analyse ont une largeur de 4 cm; ce sont soit des bandes découpées dans des chromatogrammes de composés radioactifs, soit des bandes sur la ligne médiane desquelles on a déposé tous les 5 cm des volumes connus de solutions radioactives, dans le but de déterminer leur activité dans des conditions identiques à celles utilisées pour les chromatogrammes. Le bruit de fond est obtenu en mesurant les activités des parties de la bande ne comportant pas de composés radioactifs.

L'efficacité du compteur-rapport du nombre de coups par minute enregistrés au nombre de désintégrations par minute intervenues - est de l'ordre de 4 % dans les conditions de l'essai (rayons β du ^{14}C : 0,15 MeV).

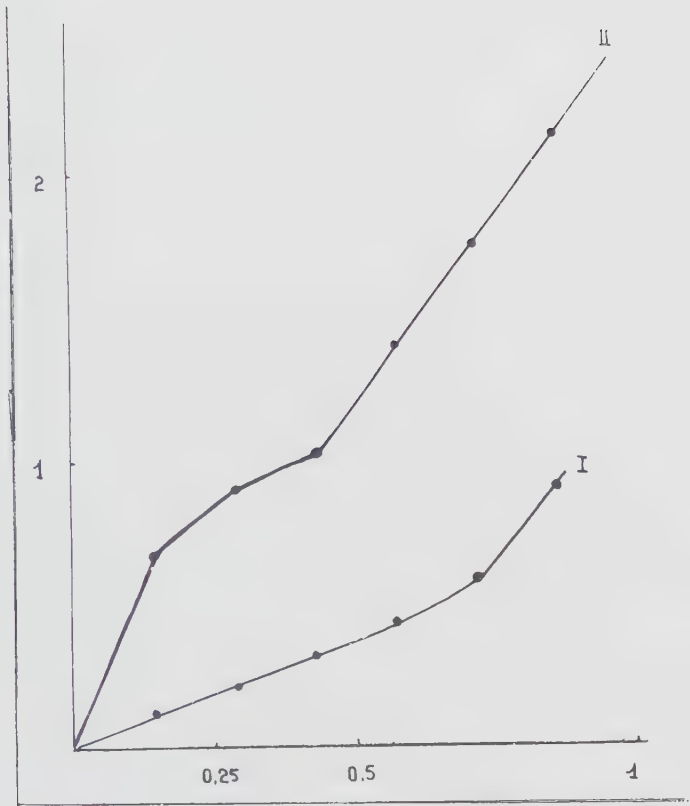


Figure 7 - Formation d'acides par action sur une solution aqueuse de D - Ribose de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

En abscisse : Energie lumineuse reçue en millieinsteins,

En ordonnée : acidité apparue en milliéquivalents.

Courbe 1 - Acidité libre,

Courbe II - Acidité totale.

II₂-2 : Molécules marquées utilisées

Nous utilisons du D-ribose uniformément marqué d'activité spécifique $1 \mu\text{ Curie par } \mu\text{M}$ (Schwartz), du D-ribose marqué sur le carbone 1 (D-ribose $^{14}\text{C}_1$) (Calbiochem) d'activité spécifique $0,8 \mu\text{ C p. } \mu\text{M}$. La pureté de ces deux produits est contrôlée en effectuant une chromatographie dans le système solvant I. (ButOH AF/H₂O). Sur une feuille de papier WHATMAN n°1 sont dessinées des bandes longitudinales de 4 cm de largeur. Les produits à chromatographier : ribose témoin, ribose ^{14}C , ribose $^{14}\text{C}_1$ sont déposés sur une ligne horizontale à 10 cm du bord supérieur de la feuille chacun sur la ligne médiane d'une des bandes longitudinales préalablement repérées. Après migration, les bandes correspondant à des produits radioactifs sont fixées sur le passeur automatique de bande et explorées par le compteur de GEIGER-MULLER. Nous calculons ensuite l'activité en coups / minute⁻¹ de chacune des sections de bandes explorées et traçons la courbe activité (en coups par minute) en fonction de la distance de migration. Pour chacun des 2 riboses marqués nous n'obtenons qu'un seul pic radioactif très aigu. La révélation au phtalate d'aniline de la bande comportant le ribose témoin montre que les pics radioactifs correspondant aux riboses marqués se trouvent bien en regard du ribose témoin.

II₂-3 : Protocole opératoire

Le milieu réactionnel comprend :

- D-Ribose 1 mM
- Peroxyde d'hydrogène 2 mM
- D-Ribose Un, ^{14}C ou
D-Ribose $^{14}\text{C}_1$ 1 μC
- Eau distillée q. s. p. 30 ml

Plusieurs essais sont réalisés en soumettant de telles solutions à une irradiation ultra-violette de deux, quatre ou six heures.

Après irradiation, chacune de ces solutions est transférée dans une capsule de pyrex anti-grimpante et évaporée à sec sous vide (0,5 mm de mercure). Le résidu sec est repris dans la capsule par 5 ml exactement mesurés d'eau distillée et la capsule placée sur de la glace pour prévenir l'évaporation de la solution. Les 5 ml de solution sont ainsi utilisés :

- nous déterminons la radioactivité totale de la solution après irradiation sur 10 spots de 20 μ l déposés tous les 5 cm sur une bande de papier WHATMAN n° 1.

- nous disposons dans deux capsules 0,5 ml de la solution. Le contenu de la première capsule, évaporé et repris par la quantité minimum d'eau distillée nécessaire pour dissoudre intégralement le dépôt est soumis à la chromatographie dans le système I, le contenu de la deuxième capsule, également évaporé à sec est conservé en glacière et destiné à une éventuelle chromatographie ultérieurement effectuée dans un autre système solvant.

- le reste, soit 3,8 ml est divisé en une fraction "acide" et une fraction "neutre" par passage sur une colonne de DO-WEX 2 selon les modalités décrites dans la Première Partie.

Les fractions "acide" et "neutre" issues de la colonne sont évaporées à sec dans des capsules.

La fraction "acide" est reprise dans la capsule par 0,5 ml d'eau distillée et la capsule maintenue à 0° pendant le dépôt de :

- 10 spots de 20 μ l destinés à la détermination de l'activité de la fraction "acide".

- 1 spot de 100 μ l destiné à être chromatographié dans le système I. Les 200 μ l restant sont évaporés à sec et conservés au réfrigérateur à 4° en vue de contrôles ultérieurs éventuels.

La fraction "neutre" est de la même façon reprise par 0,5 ml d'eau distillée et nous procédons au dépôt de :

- 10 spots de 10 μ l destinés à la détermination de l'activité de la fraction "neutre",

- 1 spot de 50 μ l destiné à la chromatographie dans le système I. Les 350 μ l restant sont évaporés à sec et conservés à 4°.

Pour doser les aldéhydes et cétones à petites molécules dont la séparation chromatographique est malaisée, nous procédons à la détermination par dilution isotopique, d'une part de la somme des composés aldéhydiques à deux carbones (glyoxal et glycolaldéhyde), d'autre part de la somme des composés aldéhydiques et cétoniques à trois carbones (glycéraldéhyde, dihydroxyacétone, réductone).

Les techniques mises en oeuvre sont inspirées de celles de BARKER et coll (8) et de celles de PHILLIPS et coll. (119).

Les fragments à deux carbones sont dosés sur une aliquote (environ 1/5) de la fraction neutre de ribose-uniformément ^{14}C soumis à une irradiation de 6 heures. Nous utilisons du glyoxal comme entraîneur non radioactif mais dans des conditions telles que nous obtenons la glyoxal-bisphénylhydrazone à partir du glyoxal et du glycolaldéhyde éventuellement présent.

Dans un ballon à fond rond muni d'un réfrigérant à reflux nous disposons :

- glyoxal (sous forme de combinaison bisulfitique)	3 mM
- fraction neutre de Ribose ^{14}C UV 6h	2 ml
- H_2O :	20 ml
- Acide acétique	1,5 ml
- Phénylhydrazine	2,5 ml

Nous maintenons au bain-marie bouillant 45 minutes.

Après ce temps, le précipité obtenu est recristallisé 6 fois dans le benzène et l'on obtient la glyoxalbispénylhydrazone pure qui fond à 170° . Son activité spécifique est déterminée par dépôt de spots sur une bande de papier WHATMAN n°1 et passage au compteur de GEIGER selon la technique décrite ci-dessus.

Pour le dosage des fragments à trois carbones, nous opérons également sur une aliquote correspondant à environ 1/5 de la quantité totale de la fraction neutre de ribose-uniformément ^{14}C soumis à une irradiation de 6 heures en présence de peroxyde d'hydrogène.

Nous utilisons comme entraîneur du glycéraldéhyde. En pratique, nous disposons dans un ballon à fond rond muni d'un réfrigérant à reflux :

- DL glycéraldéhyde	3 mM
- fraction "neutre" de ribose uniformément ^{14}C (U. V. 6 h)	2 ml
- H_2O	15 ml
- acide acétique	1 ml
- phénylhydrazine	2 ml

Nous maintenons 20 minutes au bain-marie bouillant. Puis nous ajoutons 10 à 15 ml d'eau. Il se sépare une huile et un précipité qui sont repris par du benzène. Après 6 recristallisations dans ce solvant, nous obtenons de la glycérosazone pure fondant à 129° dont nous déterminons l'activité spécifique.

II₂-4 - Précision des mesures

Si l'on fait une série de mesures de radioactivité d'une préparation, la population de valeurs obtenue présente une distribution gaussienne dont l'écart type σ est égal à $\sqrt{N}$ (N étant le nombre de coups comptés).

Si l'on exprime l'écart type en coups-minute⁻¹:

$$\sigma = \frac{\sqrt{N}}{T}$$

L'erreur relative est égale à $\frac{1}{\sqrt{N}}$ elle diminue donc quand le nombre de coups comptés augmente.

La précision de la mesure étant fonction du nombre de coups comptés, il y a avantage à travailler à nombre de coups pré-comptés constant. Toutes les mesures de radioactivité font intervenir la différence entre la radioactivité de l'échantillon et le mouvement propre de l'appareil. Dans les conditions de l'essai, il importe de tenir compte moins du mouvement propre que du bruit de fond observé sur le chromatogramme en dehors des zones radioactives.

L'erreur absolue sur la détermination d'une activité est dans ce cas égale à $\sqrt{2} \cdot \sqrt{N}$

La précision statistique P_s indique le nombre de chances pour 100 que l'on a d'obtenir un résultat qui ne soit pas compris entre $N - 2\sigma$ et $N + 2\sigma$ elle est égale à $2\sqrt{e} \times 100$

Dans le cas des chromatographies de produits radioactifs où nous comptons généralement 1000 coups par fraction de 5 mm de bande, la précision statistique est d'environ 9%. Il y a donc une probabilité de 91% que le nombre trouvé soit compris entre :

$$\frac{N - 2\sqrt{2N}}{T} \quad \text{et} \quad \frac{N + 2\sqrt{2N}}{T}$$

Dans le cas des mesures de radioactivité de solutions par dépôts de spots sur bandes de papier, nous déposons 10 spots sur chacun desquels nous comptons environ 1000 coups (300 coups par fraction de 5 mm de la bande).

La fluctuation des résultats est due d'une part à la fluctuation provenant de la nature statistique de l'émission de rayon β par le radiocarbonate, mais également aux variations aléatoires provenant d'irrégularités de la géométrie de la bande et d'erreurs volumétriques lors du dépôt. L'importance de ces deux derniers phénomènes est limitée par le nombre de mesures effectuées (dix spots). Nous déterminons la radioactivité x de chacun des spots, la moyenne des radioactivité $\bar{x}$, les carrés des écarts à la moyenne et l'écart type σ qui est égal à :

$$\sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{9}}$$

En adoptant un coefficient de sécurité de 99 % la valeur réelle μ a donc 99 chances pour 100 de se trouver dans l'intervalle de confiance :

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{2,6 \sigma}{3}$$

Cet intervalle de confiance calculé pour chaque population de valeurs est porté sur les figures.

II₂-5 - Détermination des niveaux d'attaque

La comparaison des radiochromatographies effectuées d'une part avec du D-ribose-uniformément ^{14}C et d'autre part avec du D-ribose $^{14}\text{C}_1$ (fig. 8, 9, 10) comme traceurs appelle les observations suivantes :

- la ribonolactone dont la molécule contient évidemment le carbone 1 du D-ribose manifeste une radioactivité quel que soit le traceur utilisé.

- l'acide glycolique formé par l'attaque de l'un ou l'autre des traceurs est dans les 2 cas radioactif, il contient donc le carbone 1 du D-ribose ce qui implique que l'un des mécanismes de l'action des radicaux libres sur le D-ribose entraîne la rupture de la molécule entre les carbones 2 et 3.

- l'acide glycérique qui constitue un des produits quantitativement important de la dégradation du D-ribose ne comporte pas dans sa molécule le carbone 1 du D-ribose. En effet, si la présence d'acide glycérique se manifeste par une radioactivité notable lorsque le traceur utilisé est le D-ribose uniformément marqué, par contre lors de l'utilisation du D-ribose marqué sur le carbone 1, l'acide glycérique formé ne présente aucune radioactivité. Cet acide peut donc provenir, soit d'une attaque entre les carbones 2 et 3, soit de l'attaque d'un composé à quatre carbones formé dans un premier temps.

- le cas de l'acide érythronique et de l'érythronolactone semble plus complexe. En effet pour les irradiations inférieures à 6 h la plus grande partie de l'acide érythronique apparu semble ne pas contenir le carbone 1 du D-ribose. Une très faible proportion de l'acide érythronique et de l'érythronolactone formés depuis du ribose $^{14}\text{C}_1$ est néanmoins radioactive. Par contre lors d'irradiations d'une durée supérieure à 6 heures du D - ribose $^{14}\text{C}_1$, nous obtenons un pic radioactif possédant le Rf de l'acide érythronique. La présence de ce nouveau pic pourrait s'expliquer soit par la formation dans ces conditions d'un nouveau composé possédant les caractéristiques chromatographiques de l'acide érythronique, soit plutôt par la formation d'acide érythronique par un mécanisme faisant intervenir une rupture de la chaîne carbonée du D-ribose entre les carbones 4 et 5, par exemple par décarboxylation d'acide riburonique éventuellement formé (nous avons vu dans la première partie que lors d'irradiations importantes la quantité d'acides uroniques formés augmentait considérablement).

Pour les irradiations d'énergie inférieure à 0,86 milli-einstein il semble donc néanmoins que l'acide érythronique se forme surtout par rupture de la chaîne entre les carbones 1 et 2.

Les différents acides formés par dégradation du D-ribose $^{14}\text{C}_1$ sont représentés ci-après.

En résumé, les radicaux libres hydroxyles semblent attaquer le D-ribose d'après les modalités suivantes :

- attaque sur le carbone 1 amenant la formation d'acide ribonique et de γ -D-ribonolactone.

- rupture de la chaîne entre les carbones 2 et 3 amenant la formation d'acide glycolique et peut être d'acide glycérique.

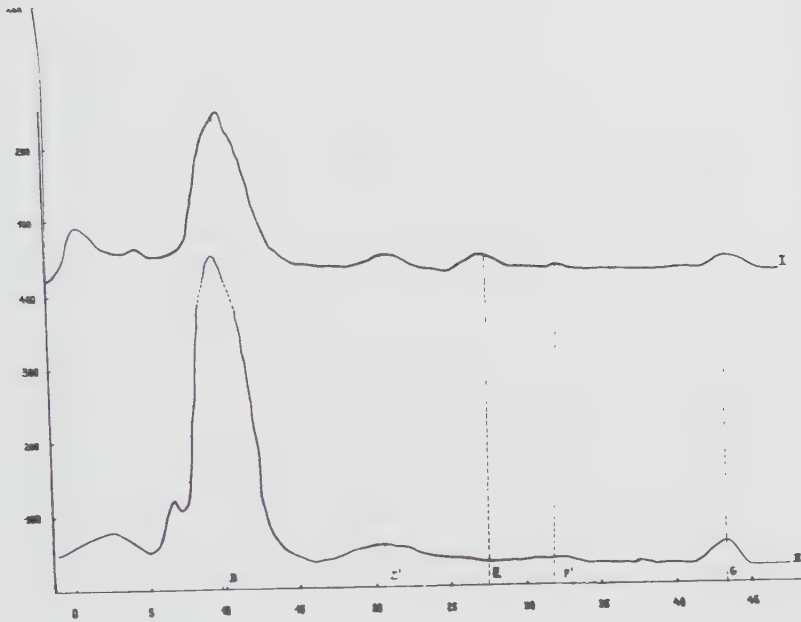


Figure 8 - Radiochromatographies des produits de dégradation du D - ribose soumis à l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène. Système solvant I (ButOH/AF/H₂O)

En abscisse : migration en cm.

En ordonnée : radioactivité en coups par minute

Courbe I = durée d'irradiation UV 6 h. Traceur : D-Ribose Un,¹⁴C.

Courbe II = durée d'irradiation UV 6h. Traceur : D - Ribose ¹⁴C 1

(les symboles littéraux sont ceux utilisés dans la première partie : B ribose, D ribonolactone, E acide glycérique, F'érythronolactone, G acide glycolique).

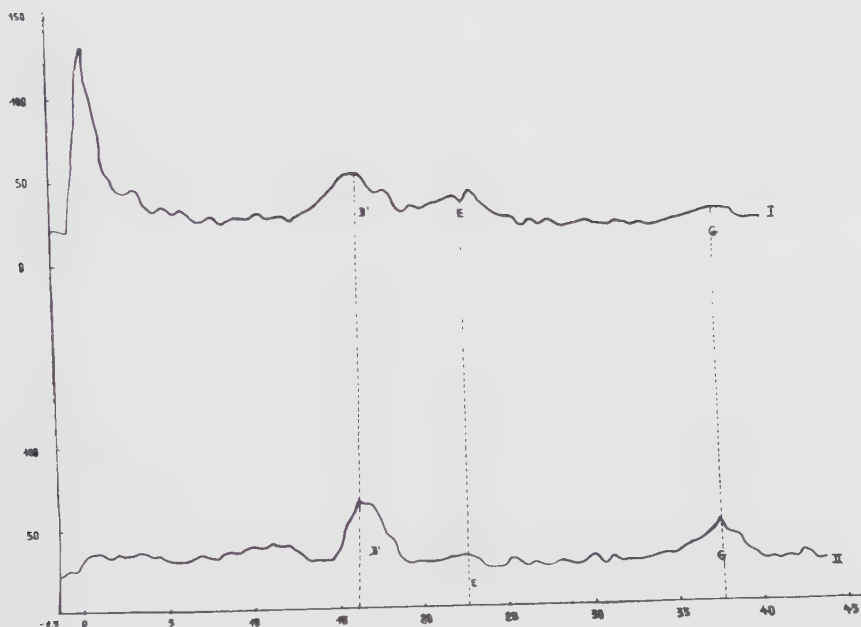


Figure 9 - Radiochromatographies de la fraction "acide" des produits de dégradation du D - Ribose soumis à l'action des radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène. Système solvant I (ButOH/AF/H₂O)

En abscisse : migration en cm.

En ordonnée : radioactivité en coups par minute

Courbe I - durée d'irradiation UV 2 h, traceur : D - ribose Un.¹⁴C.

Courbe II- durée d'irradiation UV 2 h, traceur D-ribose ¹⁴C 1

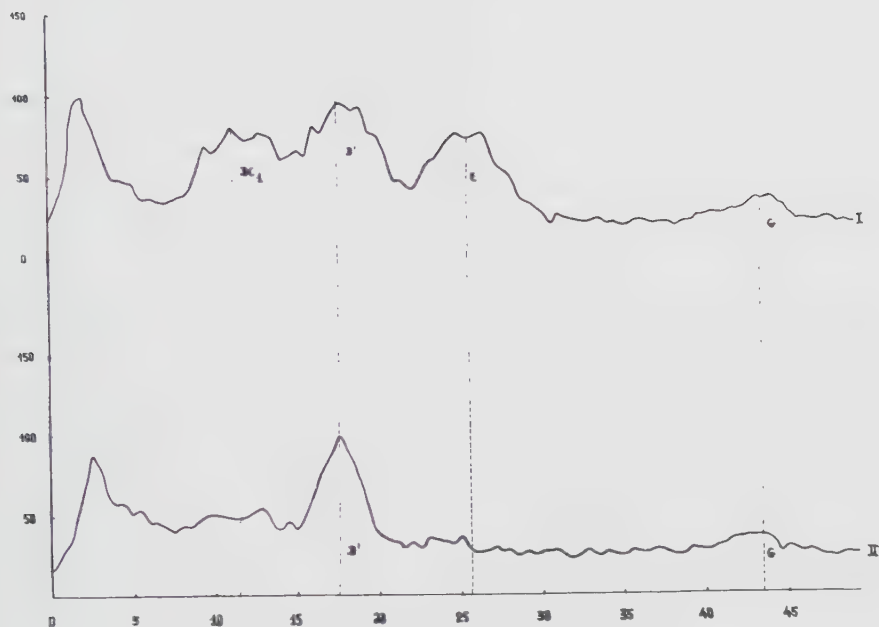


Figure 10 - Radiochromatographies de la fraction "acide" des produits de dégradation du D - Ribose soumis à l'action des radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène. Système solvant I (ButOH/AF/H₂O)

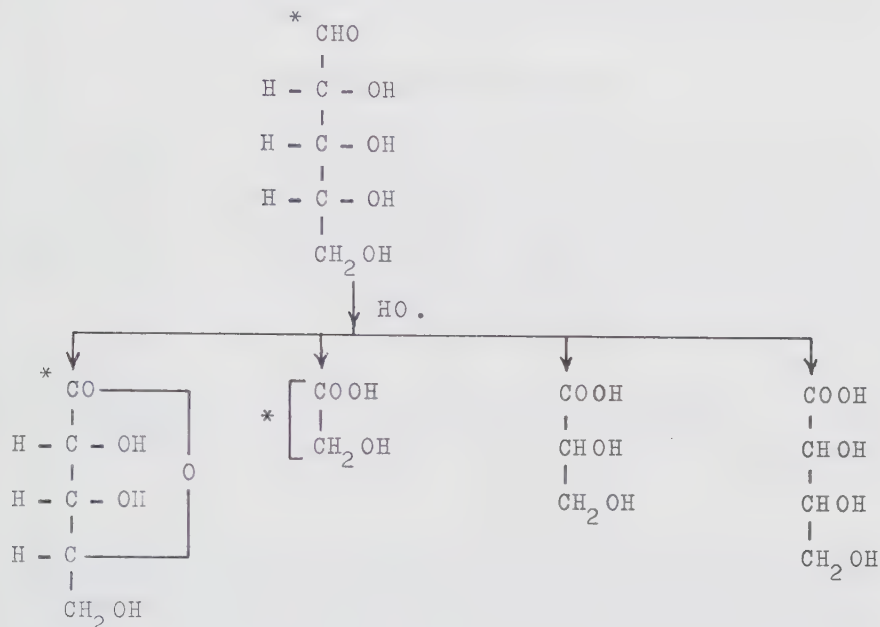
En abscisse : migration en cm.

En ordonnée : radioactivité en coups par minute.

Courbe I : durée d'irradiation UV 6 h. - traceur; D - Ribose Un, ¹⁴C

Courbe II - durée d'irradiation UV 6 h. - traceur; D - Ribose ¹⁴C 1

- rupture de la chaîne entre les carbones 1 et 2 conduisant à l'acide érythronique.



II₂-6 - Détermination des rendements relatifs. Mécanismes dégradatifs.

Les différentes activités, exprimées en coups/minute., sont rapportées à une quantité initiale de D-ribose correspondant à un microcurie.

Après passage sur colonne de DOWEX 2 la somme des activités des fractions "neutre " et "acide" est inférieure à l'activité totale du mélange avant séparation et comprise entre 50 % et 70 % de cette dernière. Les mesures effectuées sur les fractions "acide " et "neutre" ou leurs composants sont donc entachées d'une erreur systématique par défaut. Pour tenter de préciser les mécanismes réactionnels, nous avons été amenés à utiliser les rendements relatifs, de préférence aux valeurs absolues dont la signification serait beaucoup plus discutable. Les résultats donnés dans les figures 11 à 15 sont donc des représentations des phénomènes observés mais ne peuvent être utilisés pour une étude quantitative fine.

Bien que nous ayons dû nous limiter à la détermination des rendements en produits de dégradation obtenus sous l'effet de trois durées différentes d'irradiation seulement, les résultats nous paraissent très significatifs quant au mécanisme de l'action sur le D-ribose des radicaux libres hydroxyles.

II₂ -6-1- Formation de dérivés volatils

La formation de dérivés volatils est mise en évidence en étudiant les variations d'activité de la solution irradiée en fonction de l'énergie lumineuse reçue. Les courbes I des figures 11 et 12, relatives, la première à l'attaque du ribose uniformément marqué et la seconde à l'attaque du ribose marqué sur le carbone 1 font apparaître une diminution rapide de l'activité pour les énergies inférieures à 0,6 millieinstein.

La pente initiale de la courbe est de $-4,6 \cdot 10^4$ coups/minute par millieinstein dans le cas du ribose $^{14}\text{C}_1$ et de $-4 \cdot 10^4$ coups/minute par millieinstein dans le cas du ribose uniformément ^{14}C .

Le fait que ses deux valeurs soient très proches semble indiquer que les composés volatils apparus, vraisemblablement anhydride carbonique, méthanal et (ou) acide formique, se formeraient donc pour une faible part (entre 1/4 et 1/5) à partir du carbone 1 et, pour le reste, au dépens des autres carbones de la molécule.

II₂ -6-2 - Variations de l'activité de la fraction "acide" en fonction de l'énergie lumineuse reçue

Les courbes II des figures 11 et 12 représentent les variations des fractions "acide" provenant respectivement de la dégradation de ribose uniformément marqué et de ribose $^{14}\text{C}_1$. Ces fractions ne comportent que les acides fixes.

Les deux courbes présentent la même allure générale, l'activité de la fraction "acide" obtenue depuis le ribose uniformément marqué étant néanmoins légèrement plus élevée que celle correspondant à l'attaque du ribose $^{14}\text{C}_1$. (en moyenne environ 15 % de la radioactivité initiale totale pour la première et 12 % pour la seconde après 6 heures d'irradiation).

Les pentes de ces courbes diminuent quand la durée d'irradiation augmente, contrairement à ce que nous avons vu plus haut (fig. 7) lorsque l'acidité apparue est exprimée non plus en

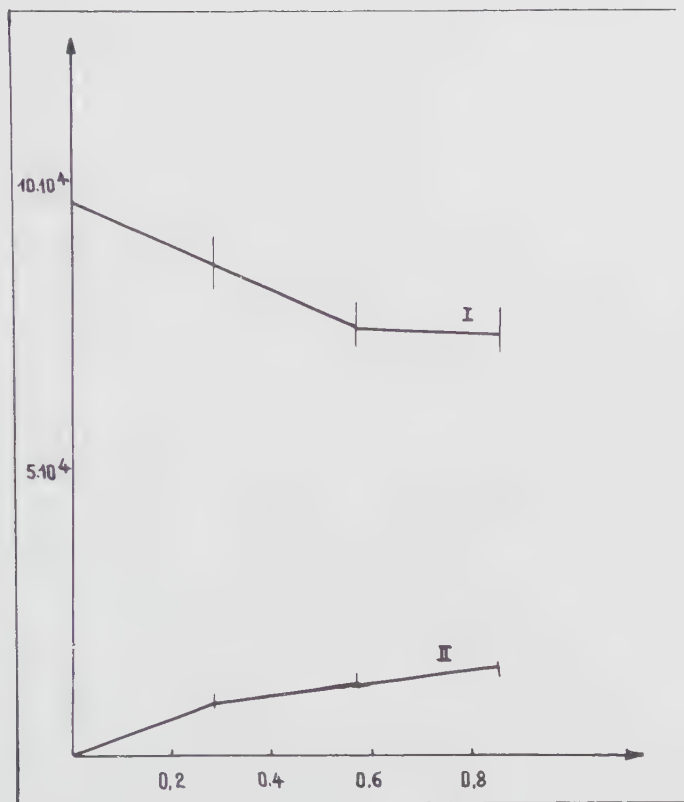


Figure 11 - Courbe I - variations de la radioactivité totale des produits non volatils existant dans une solution aqueuse de D-Ribose Un.¹⁴C et de peroxyde d'hydrogène en fonction de l'énergie lumineuse reçue.

Courbe II - variations de la radioactivité de la fraction "acide" (acides fixes) de cette solution dans les mêmes conditions.

En abscisse : énergie lumineuse reçue en millieinsteins

En ordonnée : activité en coups par minute.

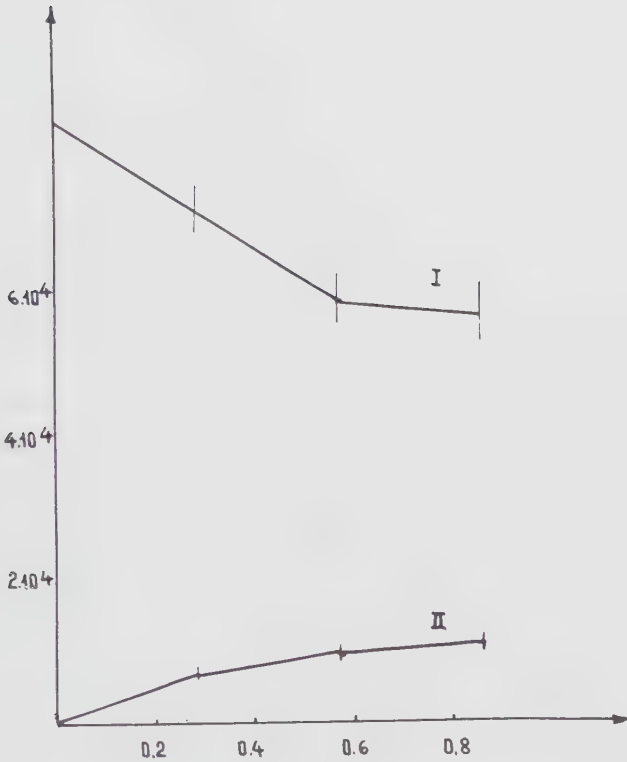


Figure 12 - Courbe I - variations de la radioactivité totale des produits non volatils existant dans une solution aqueuse de D-Ribose ^{14}C 1 et de peroxyde d'hydrogène en fonction de l'énergie lumineuse reçue.

Courbe II - variation de la radioactivité de la fraction "acide" (acides fixes) de cette solution dans les mêmes conditions.

En abscisse : énergie lumineuse reçue en millieinsteins,
En ordonnée : activité en coups par minute.

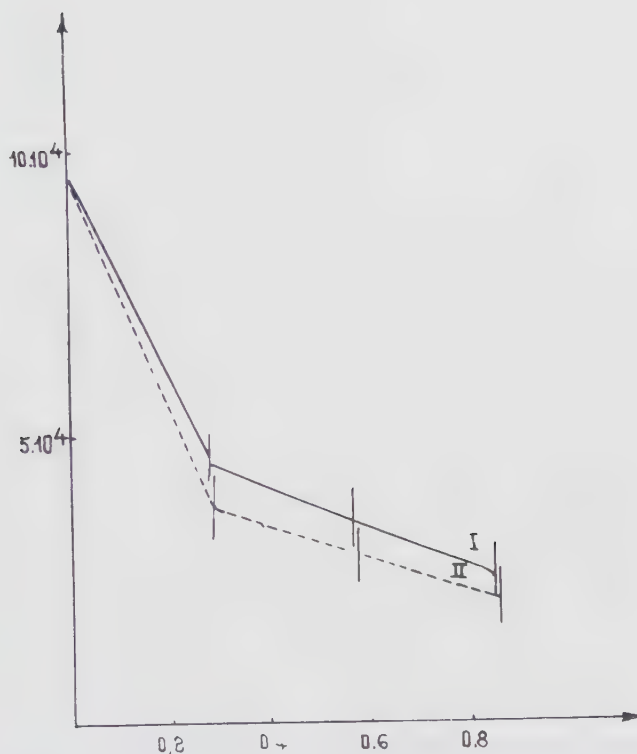


Figure 13 - Courbe I - variation de la radioactivité de la fraction "neutre" (fixe) d'une solution aqueuse de D - Ribose $\text{Un.}^{14}\text{C}$ et de peroxyde d'hydrogène en fonction de l'énergie lumineuse reçue.

Courbe II - variation de la radioactivité du ribose $\text{Un.}^{14}\text{C}$ non consommé, dans les mêmes conditions.

En abscisse : énergie lumineuse reçue en millieinsteins,

En ordonnée : radioactivité en coups par minute.

activité radioactive mais en milliéquivalents d'acidité.

Cette différence implique, si l'on considère le cas de la dégradation du ribose Un. ^{14}C , que le rapport du nombre de milliéquivalents de la fraction "acide" à la radioactivité de cette même fraction augmente avec la durée d'irradiation donc que la masse moléculaire moyenne des acides formés diminue dans ces conditions. Nous verrons plus loin qu'il en est bien ainsi (*).

II₂ -6-3 - Variations de l'activité des produits "neutres"

L'activité de la fraction "neutre" diminue au cours de l'irradiation (courbe I de la figure 13). La courbe II de la même figure montre que l'activité du ribose subit une diminution parallèle. On ne doit pas néanmoins accorder une grande signification à la valeur des distances séparant les deux courbes, les intervalles de confiance se chevauchant largement.

Les chromatographies de la fraction "neutre" provenant de la dégradation de ribose uniformément marqué ou de ribose $^{14}\text{C}_1$ confirment que le ribose est le constituant prédominant de cette fraction, en particulier, les dérivés à faible masse moléculaire, de R_T supérieurs à celui de l'érythrose ne présentent qu'une faible radioactivité diffuse dans la partie inférieure du chromatogramme.

Les expériences de dilutions isotopiques démontrent néanmoins leur formation (*) dans les solutions de ribose soumises à une irradiation de 6 heures en présence de peroxyde d'hydrogène. La quantité totale d'aldéhydes et de cétones à trois carbones est de l'ordre de 0,2 mM (activité spécifique de la glycérosazone 0,01 $\mu\text{C}/\text{mM}$) et les chainons à deux carbones sont présents à une concentration totale de l'ordre de 0,25 mM (activité spécifique de la glyoxalbisphénylhydrazone : 0,006 $\mu\text{C}/\text{mM}$).

(*) Cette différence peut s'expliquer aussi en partie par le fait que les deux séries d'expérience (dosages acidimétriques et essais au radoribose) n'ont pas été effectuées dans des conditions strictement identiques, les volumes réactionnels étant respectivement de 50 et 30 ml.

(*) Ces expériences, dans les conditions utilisées, ne fournissent qu'un ordre d'idée de la concentration des produits dosés, les activités finales mesurées étant minimales.

II₂-6-4 - Modalités de formation des différents acides

Les différents acides sont dosés en mesurant la radioactivité totale du pic correspondant sur les chromatographies de la fraction "acide". Dans le cas des acides formés depuis le ribose uniformément ¹⁴C, cette activité est multipliée par le facteur $\frac{5}{n}$ (n étant le nombre de carbones de l'acide), de façon à

obtenir une grandeur proportionnelle au nombre de molécules formées.

Les vitesses de formation des différents acides sont représentées sur les figures 14 et 15.

RIBONOLACTONE : Dans les conditions où nous opérons l'acide ribonique est presque intégralement converti en ribonolactone qui est le seul de ces deux composés que nous dosons. (Courbe I, fig. 14). La ribonolactone se forme par un mécanisme primaire, très rapidement pour les irradiations d'énergie inférieures à 0,6 millieinstein (rendement 0,08 millimole/millieinstein), la quantité existante n'augmentant ensuite que très peu dans ces conditions expérimentales.

ACIDE GLYCOLIQUE : l'acide glycolique (courbe II, fig. 14) se forme par un mécanisme primaire avec un rendement initial de 0,05 millimole par millieinstein; mais pour les irradiations d'une énergie supérieure à environ 0,6 millieinstein sa concentration diminue, sans doute sous l'effet d'une dégradation secondaire.

ACIDE GLYCERIQUE : l'acide glycérique semble se former selon un mécanisme secondaire (courbe I, trait continu fig. 15) avec un rendement initial de 0,14 millimole par millieinstein. On ne peut toutefois écarter l'hypothèse d'un mécanisme primaire (courbe I partie en trait interrompu, fig. 15) dont le rendement initial serait de 0,06 millimole par millieinstein. De toute façon, viendraient se superposer les effets du mécanisme secondaire très prépondérant.

ACIDE ERYTHRONIQUE : Dans les conditions où nous opérons l'acide érythronique se trouve presque exclusivement sous forme d'acide libre. C'est sous cette forme que nous le dosons. Il semble apparaître selon un mécanisme secondaire avec un rendement initial de 0,08 millimole par millieinstein.

Les vitesses de formation initiales relatives (rapportées à celle de la ribonolactone) sont rassemblées dans le tableau suivant :

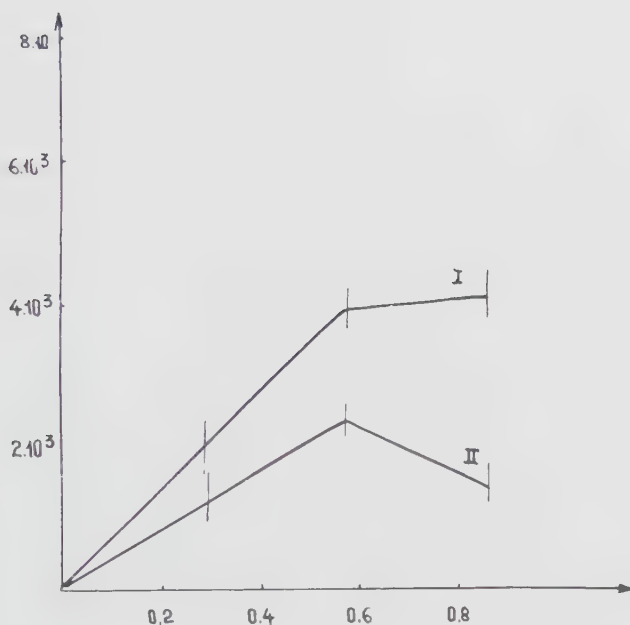


Figure 14 - Vitesses de formation de la ribonolactone (courbe I) et de l'acide glycolique (courbe II) à partir de Ribose ^{14}C -1 sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

En abscisse : énergie lumineuse reçue en millieinsteins

En ordonnée : activité en coups par minute.

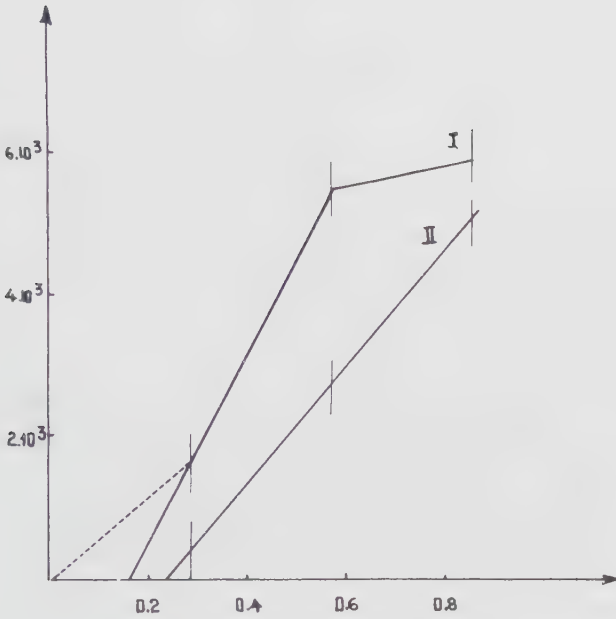


Figure 15 - Vitesses de formation de l'acide glycérique (courbe I) et de l'acide érythronique (courbe II) à partir du ribose $Un.^{14}C$ sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène (Les activités correspondant à chacun des deux corps sont multipliées par le facteur $5/n$ où n est le nombre de carbones du composé).

En abscisse : énergie lumineuse reçue en millieinsteins

En ordonnée : activité en coups par minute.

COMPOSE	Mécanisme de formation	Vitesse relative
RIBONOLACTONE	primaire	1
ACIDE GLYCOLIQUE	primaire	0,6
ACIDE GLYCÉRIQUE	Secondaire	1,75
ACIDE ERYTHRONIQUE	secondaire	1

L'utilisation de molécules de D-ribose différemment marqués permet de mettre en évidence le fait que, seuls parmi les composés acides identifiés après attaque de ce sucre par des radicaux libres hydroxyles, la ribonolactone et l'acide glycolique portent encore le carbone 1 du ribose. Cette observation et l'étude des modalités d'apparition des différents produits formés nous amènent à proposer le schéma suivant pour la dégradation du D-ribose :

- attaque sur le carbone 1 avec formation de ribonolactone par un mécanisme primaire,
- rupture de la chaîne carbonée entre les carbones 2 et 3 avec formation d'acide glycolique par un mécanisme sans doute primaire également,
- rupture de la chaîne entre les carbones 1 et 2 avec formation d'acide érythronique selon un mécanisme secondaire.
- formation d'acide glycérique ne comportant pas le carbone 1 du D-ribose selon un mécanisme paraissant également secondaire.

D'autre part, il apparaît des aldéhydes et cétones à faible condensation en carbones. Les corps colorés en bruns et ne migrant à peu près pas dans les solvants utilisés, dont la présence est constante, doivent correspondre à des produits de polymérisation.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTION SUR LE D-RIBOSE
DES RADICAUX LIBRES HYDROXYLES ENGENDRES
PAR UN REACTIF DE FENTON MODIFIE

III₁ - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

Nous utilisons un réactif de FENTON auquel est ajouté un agent chélatant, le pyrophosphate de sodium qui augmente l'activité catalytique du fer ferreux, empêche la précipitation des ions ferriques et évite les réactions parasites entre ces derniers et les produits formés (32, 106, 107).

Les proportions moléculaires mises en jeu sont de 2 moles de sulfate ferreux, 2 moles de pyrophosphate et 4 moles de peroxyde d'hydrogène pour un mole de D-ribose. En pratique, nous disposons dans un Erlemeyer bouché émeri :

- D-ribose	0, 3 mM
- Sulfate ferreux	0, 6 mM
- Pyrophosphate de sodium	0, 6 mM
- Peroxyde d'hydrogène:	1, 2 mM
- H ₂ O q. s. p.	30 ml

Nous abandonnons 6 heures à 20° puis nous éliminons les cations par passage sur résine Dowex 50 en cycle H⁺. La solution ainsi obtenue est divisée en une fraction "neutre" et une fraction "acide" selon le protocole décrit dans la première partie. Dans ces conditions, les anions pyrophosphates fixés sur la colonne de Dowex 2 ne sont pas élués par l'acide formique avec les acides organiques et ne sont donc pas gênants pour la suite des opérations.

Les fractions "acide" et "neutre" sont alors soumises à l'analyse chromatographique suivant les modalités précitées.

Lors de l'utilisation de techniques isotopiques nous ajoutons au mélange réactionnel, soit un microcurie de D-ribose-uniformément ¹⁴C soit un microcurie de D-ribose ¹⁴C₁. Nous mesurons la radioactivité des différentes fractions et effectuons des chromatographies comme décrit dans la partie II.

III₂ - RESULTATS OBTENUS

L'analyse chromatographique montre la formation d'acide ribonique et de ribonolactone, d'acide érythrone et d'érythrone, d'acide glycolique, d'acide glycérique et de faibles quantités de ribose, érythrose et fragments aldéhydiques ou cétoniques à 2 ou 3 carbones.

Les produits de dégradation sont les mêmes que ceux obtenus sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène. Il semble néanmoins que la quantité de ribosone formée soit relativement plus importante. Les radiochromatographies des fractions "acides" des produits de dégradation de ribose-uniformément ^{14}C (courbe 1, fig. 16) et de ribose $^{14}\text{C}_1$ (courbe 2, fig. 16) montrent que les niveaux d'attaque semblent être les mêmes : l'acide glycolique et l'acide ribonique étant les seuls acides comportant le carbone 1 du D-ribose. La radioactivité de la fraction acide, lorsque nous utilisons comme traceur du ribose uniformément ^{14}C est égale à environ 20 % de la radioactivité de départ.

Les différents acides se forment avec les rendements relatifs suivants (rapportés à celui de la γ -ribonolactone)

- ribonolactone : 1
- acide glycolique : 0,45
- acide glycérique : 1,2
- acide érythrone : 1

Ces résultats sont donc très voisins de ceux obtenus par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

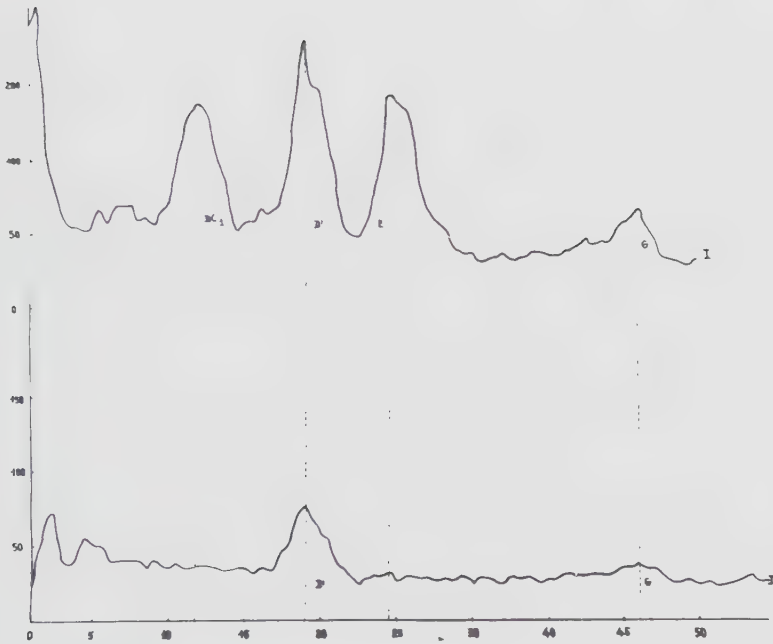


Figure 16 - Radiochromatographies de la fraction "acide" de D-Ribose traité par un réactif de Fenton. Système solvant I (ButOH/AF/H₂O).

En abscisse : migration en cm, en ordonnée : activité en coups par minute.

Courbe I - Traceur : D-Ribose uniformément marqué

Courbe II - Traceur : D-Ribose ¹⁴C - 1

QUATRIEME PARTIE

ESSAI D'INTERPRETATION DES RESULTATS

La dégradation du D-ribose par les radicaux libres hydroxyles se manifeste globalement par :

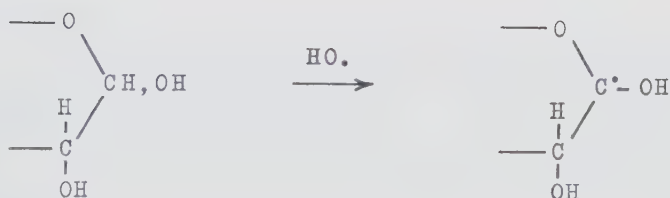
- une diminution de la quantité totale des produits "neutres", diminution parallèle à celle du D-ribose qui est le composé quantitativement important de cette fraction.

- l'apparition de dérivés volatils,

- la formation d'acides.

Le premier acide fixe formé en quantité notable par un mécanisme primaire de dégradation est l'acide ribonique (ou son olide). Son apparition correspond à une attaque sur le carbone 1 du D-ribose sans doute selon un mécanisme proche de celui proposé par BAILEY et coll. (7) pour expliquer la formation de δ -valérolactone depuis le tétrahydropyran -2-ol.

L'hydrogène porté par le carbone 1 du D-ribose serait ainsi dans un premier temps arraché par un radical hydroxyle :

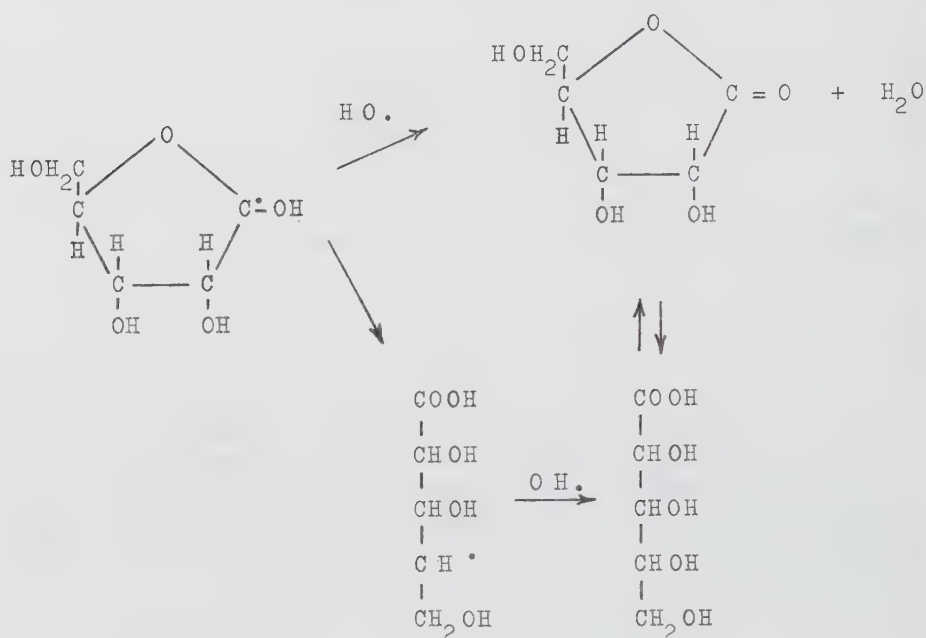


Le radical ribosyle formé pourrait alors être transformé sous l'action d'un deuxième radical hydroxyle soit en acide ribonique soit en γ -ribonolactone, ces deux composés étant d'ailleurs en équilibre.

Dans le cas du D-ribofuranose l'attaque se produirait donc selon l'un des deux mécanismes suivants :

- attaque du carbone 1 par un second radical hydroxyle et formation de γ -ribonolactone,

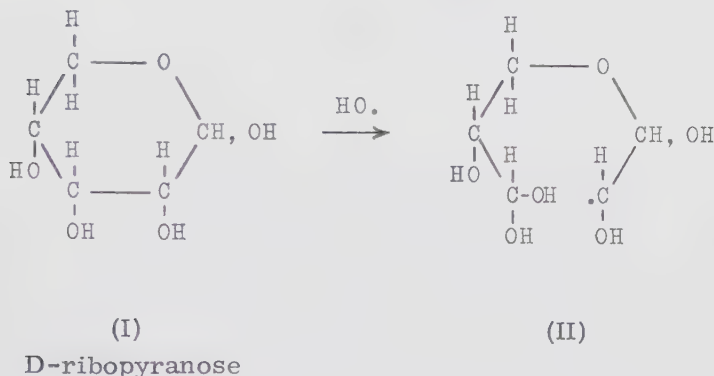
- rupture de la liaison semi acétalique avec formation d'un radical libre 4-desoxyribonyl qui sous l'action d'un deuxième radical libre hydroxyle donnerait l'acide ribonique.



Par irradiation γ du ribose en solution continuellement oxygénée, PHILLIPS et CRIDDLE (123) obtiennent de la ribonolactone qui se forme également par un mécanisme primaire. La vitesse de formation, comme dans le cas de la dégradation par photolyse de peroxyde d'hydrogène, importante pour les faibles irradiations devient rapidement très faible. Il semble donc que l'attaque du D-ribose sur le carbone 1 se produise selon les mêmes modalités, que ce corps soit soumis à l'irradiation γ ou à l'action d'un système peroxyde d'hydrogène-U.V. Elle doit donc être rapportée à l'action du radical libre hydroxyle.

Cette aptitude du radical libre hydroxyle à attaquer les aldoses sur leur carbone 1 semble d'ailleurs être un phénomène assez général : PHILLIPS et coll l'ont mise en évidence également par irradiation γ de solutions de mannose et de glucose et nous mêmes l'avons observée lors de l'action du système peroxyde d'hydrogène-U.V. sur l'érythrose.

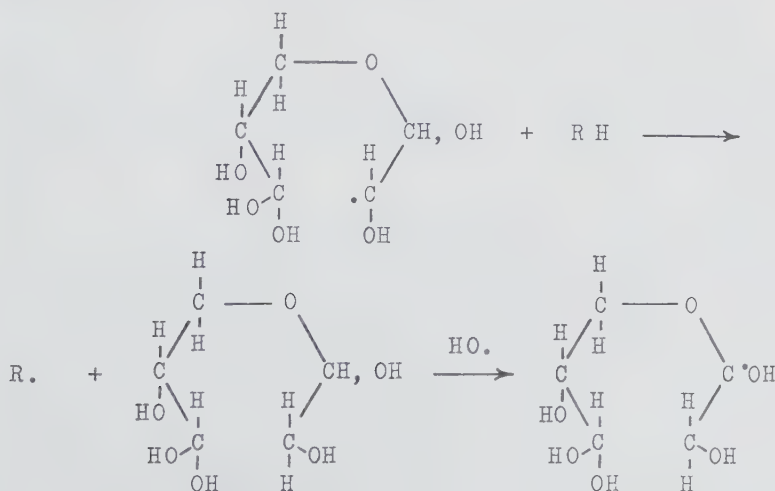
De l'acide glycolique comportant le carbone 1 du D-ribose se forme par un mécanisme qui semble primaire. Cet acide doit comporter les carbones 1 et 2 du D-ribose et doit provenir d'une rupture de la liaison entre les carbones 2 et 3 de cet ose. Il se formerait ainsi un radical libre organique (II) selon la réaction :



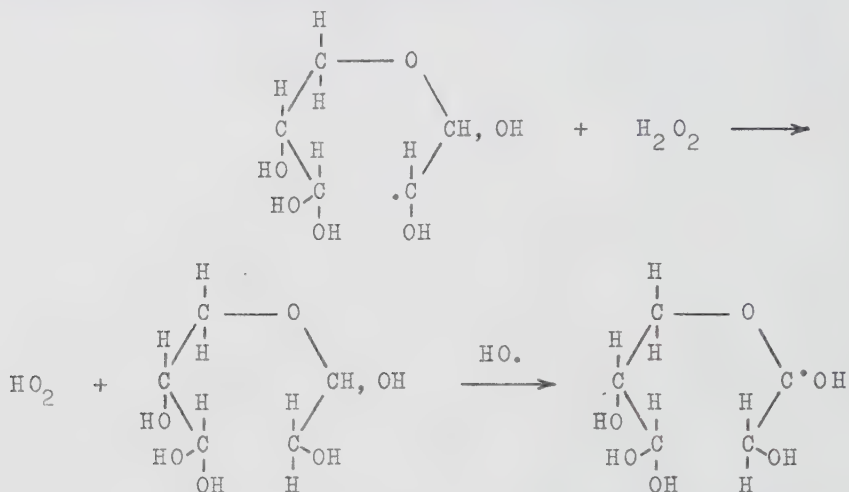
Le passage de ce radical libre à l'acide glycolique doit faire intervenir la fixation d'un atome d'hydrogène sur le carbone 2 et l'oxydation du carbone 1.

Un très grand nombre de mécanisme sont possibles, par exemple :

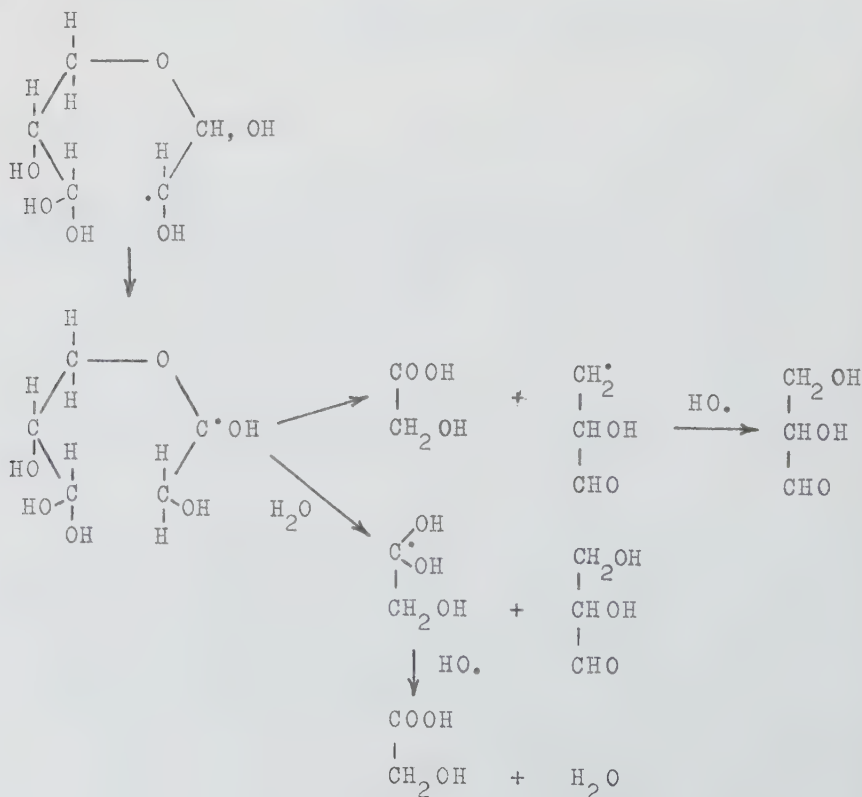
- fixation d'hydrogène sur le carbone 2 par action du radical libre sur une molécule de substrat puis action d'un radical libre hydroxyle sur le carbone 1.



- fixation d'hydrogène sur le carbone 2 par action du peroxyde d'hydrogène avec formation d' $\text{HO}_2^\bullet$ puis oxydation du carbone 1 par un radical libre hydroxyle.



- réarrangement moléculaire par migration de l'atome d'hydrogène porté par le carbone 1 sur le carbone 2, ce dernier mécanisme semblant mieux rendre compte de la nature primaire du phénomène.



Dans cette dernière hypothèse, la chaîne serait ouverte, sous l'action d'un seul radical hydroxyle avec formation d'une molécule et d'un radical libre organique. Celui-ci serait très rapidement oxydé par un deuxième radical hydroxyle. On obtiendrait ainsi pour une molécule de ribose, une molécule d'acide glycolique et une molécule de glycéraldéhyde.

Le phénomène, a priori paradoxal, d'une fixation d'hydrogène sur une chaîne détachée de la molécule par rupture d'une liaison, a été mis en évidence par PHILLIPS et CRIDDLE (119) lors de l'irradiation γ de solutions aqueuses de D-mannose en présence d'oxygène.

Par l'utilisation de mannose $^{14}\text{C}_1$, ces auteurs montrent la formation d'aldéhyde formique par rupture de la molécule entre les carbones 1 et 2. L'apparition de ce corps implique donc là aussi une rupture de liaison et une fixation d'hydrogène sur le produit formé. Cette réaction se produisant en présence d'oxygène ne peut pas être expliquée par l'action d'atomes libres d'hydrogène mais, peut être, par l'action du radical libre organique formé sur un autre substrat organique.

PHILLIPS et CRIDDLE (123) par irradiation γ prolongée de ribose n'obtiennent que de faibles quantités d'acide glycolique, par contre par autodégradation de ribose uniformément marqué (124) il s'en forme une quantité notable (40 % de la quantité de ribonolactone apparue). Les auteurs n'ont pas déterminé aux dépens de quels carbones du D-ribose cet acide se formait. Nous avons signalé dans nos propres essais l'apparition d'acide glycolique, nos résultats semblent donc en première analyse se rapprocher plus de ceux obtenus par autodégradation du ribose marqué que de ceux correspondant à une irradiation γ . Il faut noter néanmoins que l'acide glycolique formé sous l'effet d'irradiation U.V. en présence de peroxyde d'hydrogène, loin d'augmenter en fonction de l'énergie lumineuse reçue est dégradé partiellement dans les cas où l'irradiation est prolongée. On peut penser qu'un phénomène analogue limite la quantité d'acide glycolique obtenue sous l'effet d'une irradiation γ .

Il ne nous paraît pas dénué d'intérêt de noter que l'une des voies importantes du métabolisme du D-ribose chez les végétaux consiste également dans la formation d'acide glycolique au dépens des deux premiers carbones de cet ose (67).

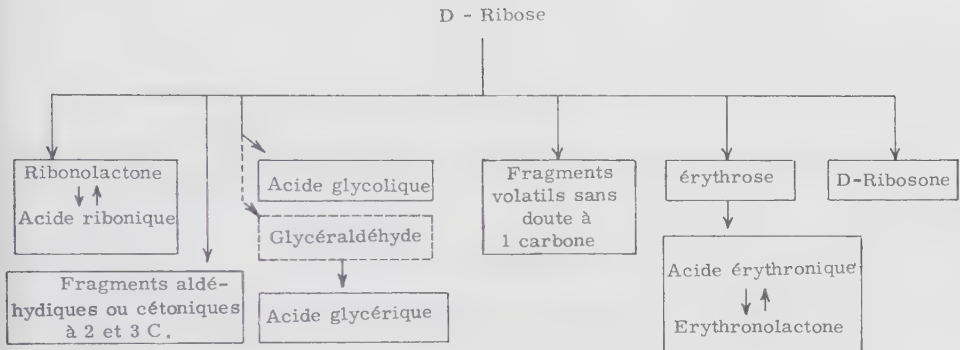
L'acide glycérique semble se former selon un mécanisme secondaire. Il pourrait provenir de l'oxydation de glycéraldéhyde apparu selon le mécanisme invoqué ci-dessus qui ne peut néanmoins rendre compte que de la formation d'environ 1/3 de l'acide glycérique présent (Les vitesses initiales de formation de l'acide glycérique et de l'acide glycolique étant sensiblement dans le rapport de 3 à 1). Il faudrait donc faire intervenir un autre mécanisme de formation, ou supposer que le chaînon à deux carbones dont la formation serait contemporaine de celle du glycéraldéhyde n'ait pas pour destinée univoque sa transformation en acide glycolique. PHILLIPS et coll. ne mettent en évidence d'acide glycérique ni après irradiation γ ni après autodégradation.

L'acide érythronique se forme par un mécanisme secondaire sans doute par oxydation d'érythrose engendré lui-même par amputation du carbone 1 du D-ribose. Par irradiation γ PHILLIPS et coll. ne mettent en évidence l'acide érythronique qu'à l'état de traces. Par contre, ils obtiennent par autodégradation du ribose marqué de notables quantités de cet acide (environ 45 % de la quantité de ribonolactone qui est le produit majeur obtenu).

L'action du système peroxyde d'hydrogène - U.V. et également celle du réactif de FENTON présentent de nombreux points communs avec celle des radiations ionisantes. Alors que l'action des rayons γ sur le ribose amène la formation d'une proportion importante de chaînes aldéhydiques ou cétoniques à 2 ou 3 carbones et relativement peu d'acides à faible condensation en carbone, l'autodégradation du même ose entraîne l'apparition d'une proportion relativement beaucoup plus importante de ces acides qui semblent être présents à des concentrations relatives encore plus grandes lorsque le ribose est soumis à l'action de l'un des deux systèmes que nous avons utilisé.

La dégradation du D-ribose sous l'action des radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène ou par un réactif de FENTON modifié semble pouvoir être ainsi résumée (*): (Cf. page suivante)

(*) pour les produits majeurs; un certain nombre d'intermédiaires instables (acides oxo-aldoniques, énediols, etc...) qui ont pu se former, ayant sans doute échappé à l'expérimentation.



Ce schéma présente de nombreux points communs
avec celui correspondant à l'action
des radiations ionisantes sur le D-Ribose.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'action du radical libre hydroxyle engendré :

- par photolyse du peroxyde d'hydrogène à 254 m μ
- par le système peroxyde d'hydrogène - fer ferreux - pyrophosphate.

Dans ces conditions expérimentales, il est possible de distinguer dans les produits de dégradation du D-ribose en solution aqueuse :

- des composés acides, notamment les acides ribonique, érythronique, glycérique, glycolique et éventuellement les olides correspondants (ribonolactone, érythronolactone)
- des composés "neutres" parmi lesquels ont été identifiés : la ribosone, l'érythrose, et des dérivés carbonyles constitués d'une chaîne à 2 ou 3 carbones.

Les mécanismes de cette attaque oxydative ont été étudiés. L'emploi de ribose uniformément marqué et de ribose $^{14}\text{C}_1$ a permis de démontrer qu'il se produisait une rupture de la chaîne carbonée en deux points, entre $\text{C}_1 - \text{C}_2$ et entre $\text{C}_2 - \text{C}_3$.

Les résultats de ces essais ne sont pas sans présenter des analogies étroites avec ceux obtenus par action des radiations ionisantes sur le D-ribose.

Vu, le Président de Thèse :

Prof. A. CIER

Vu, le Doyen

Prof. J.F. CIER

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 4 novembre 1963.

Le Recteur de l'Académie de Lyon

P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABDEL-AKHER M., SMITH F.
 The detection of carbohydrate esters and lactones after separation by paper chromatography.
 J. am. chem. Soc., 1951, 73, 5859.

- 2 - ACHESON R.M., HAZELWOOD C.M.
 The free radical nature of aromatic hydroxylation effected by oxygen ascorbic acid and ferrous ions.
 Biochim. biophys. Acta, 1960, 42, 49.

- 3 - ALLEN A.O.
 Mechanism of the radiolysis of water by gamma rays or electrons.
In : HAISSINSKY M. Actions chimiques et biologiques des radiations, 5^o série, Masson, 1961.

- 4 - ASHWELL G., WAHBA A.J., HICKMAN J.
 Uronic acid metabolism in bacteria. I. Purification and properties of uronic acid isomerase in Escherichia coli.
 J. biol. Chem., 1960, 235, 1559.

- 5 - BAILEY A.J., BARKER S.A., LLOYD I.R.L., MOORE R.M.
 Dimerization of tetrahydropyrans induced by Gamma irradiation in aqueous solution.
 Radiation Research, 1961, 15, 532.

- 6 - BAILEY A.J., BARKER S.A., STACEY M.
 Polymer production from carbohydrates.
 Radiation Research, 1961, 15, 538.

- 7 - BAILEY A.J., BARKER S.A., STACEY M.
 Effects of γ radiation. Part VII. Irradiation of 2-3-dihy-

dro-4 H pyran and related compounds.
J. chem. Soc., 1963, 1659.

- 8 - BARKER S.A., BEVINGTON J.C., BRIMACOMBE J.S.,
EADES E.D.M.

Effects of γ radiation. Part VI. Action of γ radiation
on deaerated solutions of ethylene glycol.

J. chem. Soc., 1962, 4508.

- 9 - BARKER S.A., LLOYD I.R.L., STACEY M.

Polymerization of glucose induced by gamma radiation.
Radiation Research, 1962, 16, 224.

- 10 - BATES H.C.G., URI N.

Oxidation of aromatic compounds in aqueous solution
by free radicals produced by photo excited electron
transfer in iron complexes.

J. am. chem. Soc., 1953, 75, 2754.

- 11 - BAXENDALE J.H., BYWATER S., EVANS M.G.

Molecular weight distributions in polymethyl methacry-
lates.

Trans. Faraday Soc., 1946, 42, 675.

- 12 - BAXENDALE J.H. BYWATER S., EVANS M.G.

Relation between molecular weight and intrinsic visco-
sity for polymethyl methacrylate.

J. Polymer. Sci., 1946, 1, 237.

- 13 - BAXENDALE J.H., EVANS M.G.

Velocity constants of the propagation and termination
steps in polymerisation reactions.

Trans. Faraday Soc., 1947, 43, 210.

- 14 - BAXENDALE J.H., EVANS M.G., KILHAM J.K.

Polymerization of methyl methacrylate in aqueous emul-
sions.

J. Polymer. Sci., 1946, 1, 466.

- 15 - BAXENDALE J.H., EVANS M.G., KILHAM J.K.

The kinetics of polymerization reactions in aqueous so-
lution.

Trans. Faraday Soc., 1946, 42, 668.

- 16 - BAXENDALE J.H., EVANS M.G., PARK G.S.

The mechanism and kinetics of the initiation of polymerization by systems containing hydrogen peroxide.

Trans. Faraday Soc., 1946, 42, 155.

- 17 - BAXENDALE J.H., HUGHES C.

The X-irradiation of aqueous methanol solutions. Part I. Reactions in H₂O.

Z. phys. Chem. 1958, 14, 306.

- 18 - BERCES T., TROTMAN-DICKENSON A.F.

The reaction of hydroxyl radicals with hydrocarbons in aqueous solutions.

J. Chem. Soc., 1961, 4281.

- 19 - BONHÖFFER K.F., REICHARDT H.

Zerfall von erhitztem Wasserdampf in Wasserstoff und freies Hydroxyl.

Z. phys. Chem., 1928, 139, 75.

- 20 - BOOTH J., BOYLAND E.

The biochemistry of aromatic amines. 3. Enzymic Hydroxylation by rat-liver microsomes.

Biochem. J., 1957, 66, 73.

- 21 - BOURNE E.J., HUTSON H., WEIGEL H.

Self decomposition of D-glucose ¹⁴C.

J. chem. Soc., 1960, 5153.

- 22 - BOWEN E.J.

The chemical aspects of light.

Oxford University Press Oxford, 2nd edition - 1946.

- 23 - BRAY W.C., GORIM M.H.

Ferryl-ion, a compound of quadrivalent iron.

J. am. chem. Soc., 1932, 54, 2124.

- 24 - BRESLOW R., LUKENS L.N.

On the mechanism of action of an ascorbic acid-dependent nonenzymatic hydroxylating system.

J. biol. Chem., 1960, 235, 292.

- 25 - BRODIE B.B., AXELROD J., SHORE M., UDENFRIEND D.S.

Ascorbic acid in aromatic hydroxylation : II. Products formed by reaction of substrates with ascorbic acid, ferrous ion and oxygen.

J. biol. Chem., 1954, 208, 741.

- 26 - BULEN W.A., VARNER J.E., BURREL R.E.

Separation of organic acids from plants tissues. Chromatographic technic.

Anal. Chem., 1952, 24, 187.

- 27 - CAHILL A.E., TAUBE H.

The use of heavy oxygen in the study of reactions of hydrogen peroxide.

J. am. chem. Soc., 1952, 74, 2312.

- 28 - CARLES J., SCHNEIDER A., LACOSTE A.M., SCHIAVON S.

Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques.

Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 221.

- 29 - CHARGAFF E., LEVINE C., GREEN C.

Technics for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents, sulfur containing amino acids and reducing sugars.

J. biol. Chem., 1948, 175, 67.

- 30 - CHEFTEL R.I., MUNIER R., MACHEBOEUF M.

Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. Utilisation d'une phase solvante alcaline puis d'une phase solvante acide pour la microchromatographie à deux dimensions.

Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 380.

- 31 - CHEN Y.T., ISHERWOOD F.A., MAPSON L.W.

Quantitative estimation of ascorbic acid and related substances in biological extracts by separation on a paper chromatogram.

Biochem. J., 1953, 55, 821.

32 - CIER A., NOFRE C.

Recherche sur les mécanismes de l'hydroxylation aromatique par des systèmes chimiques à processus radicalique.

Bull. Soc. Chim. Fr., 1959, 1523.

33 - CIFONELLI J.A., SMITH F.

Detection of glycosides and other carbohydrates compounds on paper chromatograms.

Anal. Chem., 1954, 26, 1132.

34 - CLARK G.L.

Les rayons X et leurs applications.

Dunod, 1961.

35 - COLOWICK S.P., KAPLAN N.O.

Methods in enzymology.

Acad. Press., N.Y. et London, 1957.

36 - COURTOIS J.E.

Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides.

Mises au point de Chimie analytique et d'analyse bromatologique, 4^e série, 1, Masson, 1956.

37 - CROSS C.F., BEVAN E.J., SMITH C.

Reactions of the carbohydrates with hydrogen peroxide.

J. Chem. Soc., 1898, 73, 463.

38 - DAINTON F.S.

Effect of gamma and x-rays on dilute aqueous solutions of acrylonitrile.

Nature, (London), 1947, 160, 268.

39 - DANIELS M., SCHOLES G., WEISS J.

"After-effect" in aqueous solutions of deoxyribonucléic acid irradiated by x-rays.

Nature (London), 1953, 171, 1153.

40 - DANIELS M., SCHOLES G., WEISS J.

Chemical action of ionising radiations in solutions
Part XVI formation of labile phosphate esters from

purine and pyrimidine ribonucléotides by irradiation with X-rays in aqueous solution.
J. chem. Soc., 1956, 3771.

41 - DANIELS M., SCHOLLES G., WEISS J., WHEELER C.M.

Chemical action of ionising radiations in solution. Part XVII. Dégradation of deoxyribonucléic acid in aqueous solution by irradiation with x-rays (200 kv).
J. chem. Soc., 1957, 226.

42 - DAVIES D.A.L.

The identification of aldoheptose sugars.
Biochem. J., 1957, 67, 253.

43 - DEBIERNE A.

Sur la décomposition de l'eau par les sels de radium.
Le radium, 1909, 6, 65.

44 - DEBIERNE A.

Sur la décomposition de l'eau par les sels de radium
C.R. Acad. Sci., 1909, 148, 703.

45 - DEBIERNE A.

Recherches sur les gaz produits par les substances radioactives décomposition de l'eau.
Ann. Phys., 1914, 2, 97.

46 - DEDONDER R.

Glucides et composés voisins.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1952, 19, 874.

47 - DENISON F.W., PHARES E.F.

Rapid method for paper chromatography of organic acids
Anal. Chem., 1952, 24, 1628.

48 - DEWHURST H.A. BURTON M.

Photolysis of hydrogen peroxide in aqueous solutions of hydrazin
Z. Phys. Chem., 1956, 19, 874.

49 - DISCHE Z., BORENFREUND E.

A new spectrophotometric method for the detection and determination of ceto sugars and trioses,
J. biol. Chem., 1951, 192, 583.

50 - EVANS M.G.

Discussion on "some aspects of the chemistry of macromolecules". 3. polymérisation of monomers in aqueous solution.

J. chem. Soc., 1947, 266.

51 - EVANS M.G., SANTAPPA M., URI N.

Photoinitiated free radical polymerization of vinyl compounds in aqueous solution.

J. Polymer. Sci., 1951, 7, 243.

52 - EVANS M.G., URI N.

Photochemical polymerisation in aqueous solutions

Nature (London), 1949, 164, 404.

53 - FENTON H.J.H.

Oxidation of tartaric acid in presence of iron.

J. chem. Soc., 1894, 65, 899.

54 - FENTON H. J. H., JACKSON H.,

The oxidation of polyhydric alcohols in presence of iron.

J. chem. Soc., 1899, 75, 1.

55 - FISCHER E., PILOTY O.

Ueber eine neue Pentonsäure und die zweite inaktive Trioxylglutarsäure.

Ber., 1891, 24, 4214.

56 - FLORKIN M., STOTZ E.H.

Comprehensive biochemistry

Elsevier 1962, volume 2, 203.

57 - FOSSE R., BRUNEL A., THOMAS P.E.

Analyse quantitative de très petites quantités d'allantoïne à de très grandes dilutions. Applications à l'urine humaine.

C.R. Acad. Sci., 1931, 192, 1615.

58 - FRICKE H.

Oxidation of ferrous sulfate in aqueous solution by x-rays of different wave lengths. Determination of Compton absorption.

Phys. Rev., 1928, 31, 1117.

59 - FRICKE H., HART E.J.

Reactions induced by the photoactivation of the water molecule.

J. Chem. Phys., 1936, 4, 418.

60 - FRICKE H., HART E.J., SMITH H.P.

Chemical reactions of organic compounds with x-rays activated water.

J. Chem. Phys., 1938, 6, 229.

61 - GAKHOKIDZA A.M.

Organomagnesium synthesis of glucosaccharinic acid from L-arabinose (en russe).

J. Gen. Chim.(U.R.S.S.)-1941,11, 109., C.A.
35, 54, 647.

62 - GODIN P.

A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses.

Nature(London)1954,174, 134.

63 - GONDOT L.

Contribution à l'étude qualitative de l'action du radical libre hydroxyle sur les acides organiques.

Thèse Pharmacie Lyon,1962.

64 - GRANT P.M., WARD R.B.

Effets of γ -radiation. Part II. Characterisation of the products from glycollic acid.

J. chem. Soc., 1959, 2654.

65 - GRAY L.H.

The presumed distributions of ions and excited groups in liquids.

J. Chim. Phys., 1951, 48, 172.

66 - GRAY L.H.

Aspects physiques de la radiobiologie. In - HAISSINSKY M. Actions chimiques et biologiques des radiations.

Première série. Masson,1955.

67 - GRIFFITH T., BYERRUM R.U.

Biosynthesis of glycolate and related compounds from ribose $^{14}\text{C}_1$ in tobacco leaves.

J. biol. chem., 1959, 234, 762.

68 - HABER F., WEISS J.

The catalytic decomposition of hydrogen peroxyde by iron salts.

Proc. Roy. Soc., 1934, 147 A, 332.

69 - HINE J.

Physical organic chemistry.

Mc Graw-Hill, N.Y., 1956.

70 - HOCHANADEL C.J.

Photolysis of dilute hydrogen peroxide solution in the presence of dissolved hydrogen and oxygen. Evidence relating to the nature of the hydroxyl radical and the hydrogen atom produced in the radiolysis of water.

Radiation Research, 1962, 17, 286.

71 - HOCKENHULL D.J.D., FLOODGATE G.D.

o-Phenylenediamine and 1-2-diamino-4-nitrobenzene as reagents for α -ketoacids

Biochem. J., 1952, 52, 38.

72 - HOGENKAMP H.P.C., BARKER H.A.

The identification of a sugar derived from coenzyme B_{12} .

J. biol. Chem., 1961, 236, 3097.

73 - HOGENKAMP H.P.C., LADD J.N., BARKER M.A.

The identification of a nucleoside derived from coenzyme

B_{12} J. biol. Chem., 1962, 237, n° 6, 1950.

74 - HOUGH L

Application of paper partition chromatography to the separation of the polyhydric alcohols.

Nature (London), 1950, 165, 400.

75 - HOUGH L., JONES J.K.N., WADMAN W.H.

Quantitative analysis of mixture of sugara by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography.

J. chem. Soc., 1950, 1702.

76 - HUNT J. P., TAUBE H.

The photochemical decomposition of hydrogen peroxide.
Quantum yields, tracer and fractionation effects.
J. am. chem. Soc., 1952, 74, 5999.

77 - INGOLD C. K.

Structure and mechanism in organic chemistry.
G. Bell and sons., London, 1953.

78 - ISHERWOOD F. A., JERMYN M. A.

Relationship between the structure of the simple sugars
and their behaviour on the paper chromatogram.
Biochem. J., 1951, 48, 515.

79 - JAYSON G. G., SCHOLLES G., WEISS J.

Chemical action of ionising radiations in solution. Part XX.
Action of x-rays (200 kv) on ethanol in aqueous solution.
J. chem. Soc., 1957, 1358.

80 - JOHNSON G. R. A., STEIN G., WEISS J.

Some free radical reactions of chlorobenzene. The action
of hydrogen peroxide ferrous salt in reagent and of x-
rays on aqueous solutions of chlorobenzene.
J. chem. Soc., 1951, 3275.

81 - JOHNSON G. R. A., SCHOLLES G., WEISS J.

Chemical action of ionising radiations in solution. Part XI.
The action of free radicals, produced by x-rays on lactic
acid in aqueous solution with particular reference to the ef-
fect of molecular oxygen.
J. chem. Soc., 1953, 3091.

82 - JULIA M.

Mecanismes electroniques en chimie organique.
Gauthiers Villars, Paris, 1961.

83 - KORNFIELD G.

Die photochemische Zusetzung des Wasserstoff superoxyds
in Wasseriger Lösung.
Z. Physik. Chem., 1935, 29, 205.

84 - KÜCHLIN A.T.

Die Fentonsche Reaktion (IV. Mitteilung).

Rec. Trav. chem., Pays-Bas, 1932, 51, 887.

85 - KÜCHLIN A.T.

Die Fentonsche Reaktion.

Biochem. Z., 1933, 261, 411.

86 - LANNING M.C., COHEN S.S.

The detection and estimation of 2 ketohectic acids-

J. biol. chem., 1951, 189, 109.

87 - LATIMER W.M.

The oxidation states of the elements and their potentials in aqueous solution.

2nd edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs., New Jersey, 1952.

88 - LEA D.E.

Termination reaction in the photolysis of hydrogen peroxide in dilute aqueous solutions.

Trans. Faraday Soc., 1949, 45, 81.

89 - LEA D.E.

Actions of radiations on living cells.

Cambridge University Press. London, 1955.

90 - LEDERER E.

Chromatographie en chimie organique et biologique -

2 vol. Masson & Cie, 1959-1960.

91 - LEFORT M.

Chimie des radiations des solutions aqueuses. Aspect actuel des résultats expérimentaux.

In HAISSINSKY. Première série. Masson, 1955.

92 - LEVENE P.A., JACOBS W.A.

Ueber die Pentose in den Nucleinsäuren.

Ber., 1909, 42, 3247.

93 - LOEBL H., STEIN G., WEISS J.

Hydroxylation of nitrobenzen.

J. chem. Soc., 1949, 2074.

94 - LOEBL H., STEIN G., WEISS J.

Chemical actions of ionising radiations on aqueous solutions. Part V. Hydroxylation of nitrobenzen by free radicals produced by x-rays

J. chem. Soc., 1950, 2704.

95 - LOEBL H., STEIN G., WEISS J.

Chemical actions of ionising radiations on aqueous solutions. Part VIII. Hydroxylation of benzoic acid by free radicals produced by x-rays.

J. chem. Soc., 1951, 405.

96 - MERZ J.H., WATERS W.A.

The oxidation of aromatic compounds by means of the free hydroxyl radical.

J. chem. Soc. 1949, 2427

97 - MITCHELL D.L.

Dégradation of D-ribo-1-4 lactone to D-erythro-1-4 lactone.

Can. J. chem., 1963, 41, 214.

98 - MORRELL R.S., CROFTS J.M.

Action of hydrogen peroxide on carbohydrates in the presence of ferrous salts. I.

J. chem. Soc., 1899, 75, 786.

99 - MORREL R.S., CROFTS J.M.

Action of hydrogen peroxide on carbohydrates on the presence of ferrous salts. II.

J. chem. Soc., 1900, 77, 1219.

100 - MORREL R.S., CROFTS J.M.

Action of hydrogen peroxide on carbohydrates in the presence of ferrous salts. III.

J.chem., Soc., 1902, 81, 666.

101 - MORREL R.S., CROFTS J.M.

Action of hydrogen peroxid on carbohydrates in the presence of ferrous sulphate. IV.

J. chem. Soc., 1903, 83, 1284.

102 - NEF J. U.

Dissociationsvorgänge in der Zuckergruppe. Erste Abhandlung : Ueber des Verhalten der Zuckerarten gegen die Fehlingsche Lösung sowie gegen andere Oxydationsmittel
Liebigs Ann., 1907, 357, 214.

103 - NEISH W. J. P.

α - keto acid determination. In : Methods of biochemical analysis.

Vol. 5, GLICK D. edit., Interscience Publisher N.Y., 1954.

104 - NEUBERG C., KITASOTO T.

Synthese der α -keto D-gluconsäure.

Bioch. Z. 1927, 183, 485.

105 - NOFRE C., CIER A., LEFIER A.

Activation de l'oxygène moléculaire en solution aqueuse par les ions métalliques et leurs chélates.

Bull. Soc. Chim. Fr., 1961, p. 530.

106 - NOFRE C., CIER A., MICHOU-SAUCET C., PARNET J.

Action des radicaux libres hydroxyles sur les acides aminés.

C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 811.

107 - NOFRE C., WELIN L., PARNET J., CIER A.

Action du radical libre hydroxyle sur les acides aminés

Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 1237.

108 - NORDMANN R., GAUCHERY O., du RUISSEAU J. P., THOMAS Y., NORDMANN J.

Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. I. L'urine. Techniques chromatographiques.

Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, n° 10, 1461.

109 - OSTEUX R., LATURAZE J.

Chromatographie sur papier des acides organiques fixes de l'urine.

C.R. Acad. Sci., 1954, 239, 512.

- 110 - OVEREND W.G., STACEY M., WIGGINS L.F.

Deoxy sugars, Part IV. A synthesis of 2-deoxy-D-ribose from D-erythrose.

J. chem. Soc., 1949, 1358.

- 111 - PAECH K., TRACEY M.V.,

Modern methods of plant analysis.

Springer, Berlin, 1955.

- 112 - PARTRIDGE S.M.

Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep.

- Biochem. J., 1948, 42, 238.

- 113 - PARTRIDGE S.M.

Anilin hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars.

Nature, (London), 1949, 164, 443.

- 114 - PERCIVAL E.

Aldonic, uronic, oxoaldonic and ascorbic acids. In : Comprehensive biochemistry, Edit. FLORKIN M. et STOZTZ E.M., vol 5, Elsevier, 1963.

- 115 - PHILLIPS G.O.

Action of ionizing radiation on aqueous solutions of carbohydrates.

Nature, (London), 1954, 173, 1044.

- 116 - PHILLIPS G.O.

Radiation chemistry of carbohydrates.

Adv. Carb. Chem., 1961, 16, 13.

- 117 - PHILLIPS G.O.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part XII. Action of ionising radiations on aqueous solutions of D-mannitol.

J. chem. Soc, 1963, 297.

- 118 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Proc. Interm. Conf. Radioactive Isotopes (Copenhagen), 1960. Cité in (116).

119 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part VI.
Action of gamma radiation on aqueous solutions of
D-mannose in oxygen.

J. chem. Soc., 1960, 3404.

120 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part VII.
Action of gamma radiation on aqueous solutions of
D-sorbitol in oxygen.

J. chem. Soc., 1961, 3756.

121 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part VIII.
Action of gamma radiation on deaerated solutions of
D-sorbitol.

J. chem. Soc., 1961, 3763.

122 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part IX.
The action of gamma radiation on deaerated D-manno-
se solutions.

J. chem. Soc., 1962, 2733.

123 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part X.
Action of gamma radiation of aqueous D-ribose solu-
tions in oxygen.

J. chem. Soc., 1962, 2740.

124 - PHILLIPS G.O., CRIDDLE W.J., MOODY G.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part XI.
Self decomposition of D - (^{14}C) mannose, D - (^{14}C)
ribose, and D - (^{14}C) fructose.

J. chem. Soc., 1962, 4216.

125 - PHILLIPS G.O., MATTOCK G.L., MOODY G.J.

Action of ionizing radiations on aqueous solutions of
carbohydrates.

Proc. Interm. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy,
Genève, 1958, 29, 92.

126 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Chemical action of gamma radiation on aqueous solutions of carbohydrates.

Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes, 1959, 6, 78.

127 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Action of ionising radiations on solid carbohydrates.

Chem. Ind., London, 1959, 1247.

128 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part III.

The effect of gamma radiation on aqueous solutions of D-fructose.

J. chem. Soc., 1960, 754.

129 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J., MATTOCK G.L.

Radiation chemistry of carbohydrates, Part I.

Action of ionising radiation on aqueous solutions of D- glucose.

J. chem., Soc., 1958, 3522.

130 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part II.

Irradiation of aqueous solutions of dextran with gamma radiation.

J. chem. Soc., 1958, 3534.

131 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part III.

The effect of gamma - radiation on aqueous solutions of D -fructose.

J. chem. Soc., 1960, 754.

132 - PHILLIPS G.O., MOODY G.J.

Radiation chemistry of carbohydrates. Part IV.

The effect of gamma radiation on aqueous solution of sucrose.

J. chem. Soc., 1960, 762.

133 - PLATZMANN R.L.

Subexcitation electrons.

Radiation Research, 1955, 2, 1.

134 - RAMSAY J., SODDY F.

Experiments in radioactivity and the production of helium from radium.

J. chem. Soc., 1903, A, II, 622.

135 - REICHSTEIN T.

Derivate der 2 keto-L -ribonsäure und ihre Umlagerung in 3-keto L -pentonsäurelaktone einen ascorbinsäure anhänglichen Stoff der C5 Reihe.

Helv. chem. Acta, 1934, 17, 1003.

136 - REICHSTEIN T., GRÜSSNER A., OPPENAUER R.

Synthese der Ascorbinsäure und verwandten Verbindungen nach der Oson-Blausäure -Methode.

Helv. chem. Acta, 1934, 17, 510.

137 - REICHSTEIN T., GRÜSSNER A., OPPENAUER R.

Synthese der D - und L - ascorbinsäure (C-Vitamin).

Helv. Chem. Acta, 1933, 16, 1019.

138 - RUFF O.

Ueber die Verwandlung der D-gluconsäure in D-arabinose.

Ber., 1898, 31, 1573.

139 - RUFF O.

D -Erythrose.

Ber., 1899, 32, 3672.

140 - SCHOLES G., TAYLOR W., WEISS J.

Chemical action of ionising radiations in solution, Part XVIII. Action of X-rays (200 Kv) on α - and β -glycerophosphate on aqueous solution.

J. chem. Soc., 1957, 235-246.

141 - SCHOLES G., WEISS J.

Chemical action of ionising radiations on nucleic acids in aqueous systems.

Nature (London), 1950, 166, 640.

142 - SCHOLES G., WEISS J.

Formation of labile phosphate esters by irradiation of

nucleic acids with X-rays in aqueous systems.
Nature (London), 1953, 171, 920.

143 - SCHOLES G., WEISS J.

Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems. I. Degradation of nucleic acids, purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides by X-rays and by free radicals produced chemically.

Biochem. J., 1953, 53, 567.

144 - SCHOLES G., WEISS J.

Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems. II. The mechanism of the action of X-rays on nucleic acids in aqueous systems.

Biochem. J., 1954, 56, 65.

145 - SMILEY J.D., ASHWELL G.

Purification and properties of β -L-hydroxyacid dehydrogenase. II.

J. biol. Chem., 1961, 236, 357.

146 - STEIN G., WEISS J.

Chemical actions of ionising radiations on aqueous solutions. Part II. The formation of free radicals. The action of X-rays on benzene and benzoic acid.

J. chem. Soc., 1949, 3245.

147 - STEIN G., WEISS J.

Détection de free hydroxyl radicals by hydroxylation of aromatic compounds.

Nature, (London), 1950, 166, 1104.

148 - STEIN G., WEISS J.

Some free radical reactions of phenol. The action of the hydrogen peroxide -ferrous salt reagent and of X-rays on aqueous solution of phenol.

J. chem. Soc., 1951, 3265.

149 - TCHOUBAR B.

Les mécanismes réactionnels en chimie organique.
Dunod Paris 1960.

- 150 - TRONCHET J.M.J., CIER A., RAVIER M.A., NOFRE C.
 Action du radical libre hydroxyle sur le D-ribose.
 C. R. Acad. Sci., 1963, 256, 2433.
- 151 - UDENFRIEND S., CLARK T., AXELROD J., BRODIE B.B.
 Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation.
 J. biol. Chem., 1954, 208, 731.
- 152 - URI N.
 Inorganic free radicals in solution.
 Chem. Rev., 1952, 50, 375.
- 153 - VAISEY E.B., THATCHER F.S.
 Effect of gamma rays on solutions of adenosine triphosphate and ribose.
 Radiation Research, 1962, 17, 74.
- 154 - WALEY S.G.
 Mechanisms of organic and enzymic reactions.
 Oxford at the Clarendon Press, 1962.
- 155 - VANDENBERG E.J., HULSE G.E.
 Cumene hydroxyperoxide in oxidation. - reduction, emulsion. polymerization.
 Ind. Eng. Chem., 1948, 40, 932.
- 156 - WALLING C.
 Free radicals in solution.
 Wiley, 1957.
- 157 - WEISS J.
 Radiochemistry of aqueous solutions.
 Nature, (London), 1944, 153, 748.
- 158 - WEISS J.
 Nature of "active" oxalic acid.
 Discussions Faraday Soc., 1947, 188.
- 159 - WEISS J.
 One -electron versus two-electrons transfer processes

in the mechanism of oxidation -reduction in solution.
Nature, (London), 1958, 181, 825.

160 - WOHL A.

Abbau des Traubenzuckers.
Ber., 1893, 26, 730.

oOo

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
A - GENERALITES	
I - Le radical libre hydroxyle - Nature Modes de formation:	3
I ₁ - Le radical libre hydroxyle	3
I ₂ - Formation de radicaux libres hydroxyles par voie physique.	4
I ₂ -1- Formation de radicaux libres hydroxyles par radiolyse de l'eau au moyen de radia- tions de grande énergie corpusculaires ou électromagnétiques.	4
I ₂ -2 - Formation de radicaux libres hydroxyles par des réactions photochimiques provo- quées par irradiation U. V.	8
I ₃ - Formation de radicaux libres hydroxyles par voie chimique.	9
I ₃ -1- Formation de radicaux libres hydroxyles par des systèmes redox comportant du peroxyde d'hydrogène.	9
I ₃ -2- Formation de radicaux libres hydroxyles par des systèmes redox comportant de l'oxygène moléculaire.	10
II - Action du radical libre hydroxyle sur les sucres et les composés apparentés .	11
B - TRAVAIL PERSONNEL	
I - Première partie : Etude qualitative de l'action sur le D-ribose des radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène.	
I ₁ - Conditions expérimentales de l'attaque radica- laire.	15
I ₂ - Analyse chromatographique des produits de dégradation du D-ribose.	16

	Pages
I ₂ -1 - Techniques chromatographiques utilisées	16
I ₂ -2 - Techniques utilisées pour la synthèse de produits nécessaires à l'expérimentation.	20
I ₂ -3 - Résultats obtenus.	33
I ₃ - Séparation des produits de dégradation du D-ribose en une fraction "acide" et une fraction "neutre"	42
I ₃ -1 - Analyse qualitative de la fraction acide.	43
I ₃ -1-1- . Etude par chromatographie sur papier	43
I ₃ -1-2- Etude par chromatographie sur acide silicique.	47
I ₃ -1-3 - Recherche des acides oxoaldoniques.	48
I ₃ -1-4 - Recherche des acides uroniques.	52
I ₃ -2 - Analyse qualitative de la fraction neutre.	55
I ₃ -2-1 - Etude par chromatographie sur papier.	55
I ₃ -2-2 - Action de la 2-4-dinitrophénylhydrazine.	56
I ₃ -2-3 - Action du 1-2-diamino-4-nitrobenzène.	56
I ₃ -2-4 - Réduction.	56
I ₃ -2-5 - Oxydation.	59
II - Deuxième partie : Etude du mécanisme de la dégradation du D-ribose sous l'action de radicaux libres hydroxyles engendrés par photolyse du peroxyde d'hydrogène.	
II ₁ - Dosage volumétrique de l'acidité apparue.	65
II ₂ - Essais à l'aide de molécules marquées.	66
II ₂ -1- Appareillage.	66
II ₂ -2- Molécules marquées utilisées.	69
II ₂ -3- Protocole opératoire.	69
II ₂ -4- Précision des mesures	72
II ₂ -5- Détermination des niveaux d'attaque.	73
II ₂ -6- Détermination des rendements relatifs. Mécanismes dégradatifs.	81
II ₂ -6-1- Formation de dérivés volatils.	82
II ₂ -6-2- Variations de l'activité de la fraction "acide".	82

III

	Pages
II ₂ -6-3- Variations de l'activité des produits "neutres".	89
II ₂ -6-4- Modalités de formation des différents "acides".	90
III-Troisième partie : Etude de l'action sur le D-ribose des radicaux libres hydroxyles engendrés par un réactif de Fenton modifié.	
III ₁ - Protocoles expérimentaux et techniques analytiques.	97
III ₂ - Résultats obtenus.	98
IV - Quatrième partie : Essai d'interprétation des résultats.	101
V - CONCLUSIONS GENERALES	109
BIBLIOGRAPHIE .	111

